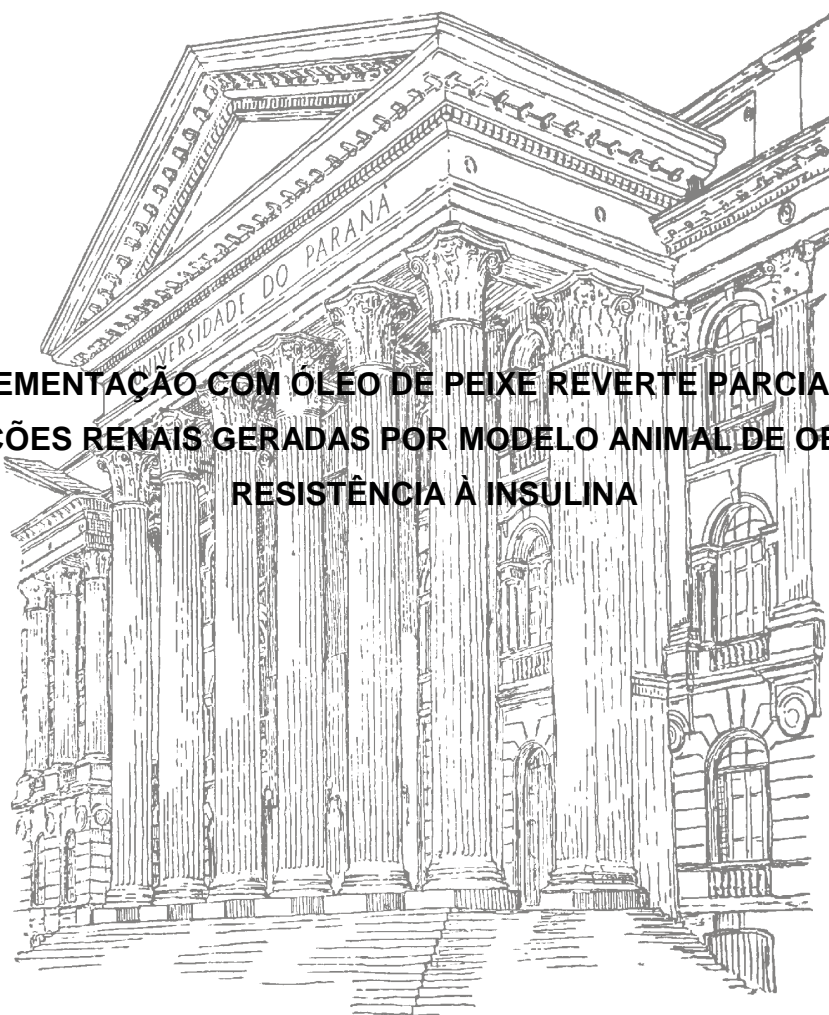


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABELA COELHO DE CASTRO

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE REVERTE PARCIALMENTE
ALTERAÇÕES RENAIS GERADAS POR MODELO ANIMAL DE OBESIDADE E
RESISTÊNCIA À INSULINA**



CURITIBA

2014

ISABELA COELHO DE CASTRO

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE REVERTE PARCIALMENTE
ALTERAÇÕES RENAIIS GERADAS POR MODELO ANIMAL DE OBESIDADE E
RESISTÊNCIA À INSULINA**

Tese apresentada como requisito para
obtenção do título de doutor em Biologia
Celular e Molecular, área de concentração
em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Fernandez
Perez

CURITIBA

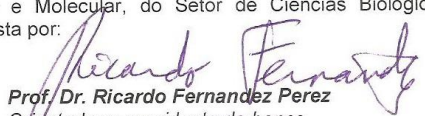
2014

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR


Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dr. Ricardo Fernandez Perez

Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra

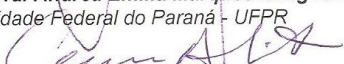
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP


Profa. Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire

Universidade Federal do Paraná - UFPR


Profa. Dra. Andréa Emilia Marques Stinghen

Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita

Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR.

E tendo como suplentes,

Profa. Dra. Viviane Prodócimo


Universidade Federal do Paraná - UFPR

Profa. Dra. Katya Naliwaiko

Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a candidata Isabela Coelho de Castro, em relação ao seu trabalho intitulado: "Suplementação com óleo de peixe reverte parcialmente alterações renais em modelo de obesidade e resistência à insulina", são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** acadêmica, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Fisiologia.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.


Prof. Dr. Eduardo da Silva Andrade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 165795

Curitiba, 20 de Março de 2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois nada seria possível.

À minha família, em especial minha mãe e madrinha, pelo suporte material, espiritual e emocional em todas as fases da minha vida. Agradeço pelo apoio incondicional à minha educação e formação pessoal e profissional. Sem vocês nada faria sentido.

Ao meu marido, Kleiton, pelo companheirismo, carinho e amor em todas as etapas e pela paciência, principalmente, nesta fase. Obrigada por tudo.

Ao professor Ricardo, pela orientação, apoio e dedicação, não só no mestrado e/ou doutorado, mas na minha formação como pessoa e como profissional, agradeço por sua amizade e pela confiança dedicada em mim.

Ao professor Luiz Claudio, pelo apoio, orientação, auxílio e amizade. Agradeço pelo acolhimento em seu laboratório.

À companheira de projeto e amiga Dani, os problemas se tornaram menores com a nossa parceria.

Às amigas de rotina e de vida Adri, Dani, Gina e Júlia. Obrigada por toda ajuda e suporte meninas.

Agradeço a todos meus amigos externos e internos da universidade. Em especial, Aldre, Amanda, Ana, Profa. Ana Lúcia, Ana Lúcia, Andréia, Andressa, Anna Gabrielle, Carol, Chelin, Dalton, Dalva, Denise, Diogo, Everson, Fabi, Fernando, Giordano, Gleisson, Jaque, Júlia, Juliano, Letícia, Loli, Mauro, Milene, Priscila, Rica, Rica Tanhoffer, Raciele, Ricelli, Sandro, Sérgio, Taísa, Valéria e tantos outros que auxiliaram de alguma maneira neste trabalho.

À profa. Dra. Carolina de Arruda de Oliveira Freire pelas dosagens da osmolalidade plasmática e urinária tanto para a dissertação de mestrado e para esta tese. Agradeço imensamente a ajuda. Agradeço, ainda, a todos do laboratório de Osmorregulação pelo auxílio e pela amizade.

À profa. Dra. Terezila Machado Coimbra por permitir a realização das lâminas de imunohistoquímica em seu laboratório para este trabalho e para o trabalho anterior.

Agradeço à disponibilidade, atenção e ajuda da Cleonice e da pós-doutoranda Heloísa. Muito obrigada.

À profa. Dra. Maria Consuelo Andrade Marques e suas alunas Priscila, Rita e Sandra, pelo auxílio e empréstimo das gaiolas metabólicas.

Aos profs. Drs. Patrício Peralta-Zamora e Sérgio Renato Vaz e aos técnicos do Laboratório Central de Química, pela ajuda nas dosagens de eletrólitos.

À profa. Dra. Katya Naliwaiko e à técnica Maria da Graça, pelo auxílio nas leituras do perfil lipídicos das nossas amostras pelo HPLC.

Ao prof. Dr. Roberto Bazotte e ao Dr. Helenton pela disponibilidade e atenção no processo de padronização das rações para o modelo experimental proposto.

Ao pessoal do Biotério do Setor de Ciências Biológicas, em especial ao Marcelo e Iselen, por toda ajuda no cuidado dos animais.

À Alessandra e Israel na captação das imagens de imunohistoquímica.

Ao estatístico Msc. Anderson Scorsato, pelo auxílio na análise dos dados.

Ao prof. Dr. Edvaldo Trindade, à Marlene e à pós-graduação.

Aos professores da banca do evento dos doutorandos: Profa. Dra. Anita Nishiyama, Profa. Dra. Katya Naliwaiko e Profa. Dra. Olga Chaim.

Aos professores da banca de defesa da tese, Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra, Profa. Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire, Profa. Dra. Andréa Emilia Marques Stinghen, Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita, Profa. Dra. Viviane Prodócimo e Profa. Dra. Katya Naliwaiko, agradeço a disponibilidade de participação deste evento.

À Capes e CNPq pelo auxílio financeiro.

MUITO OBRIGADA!

Un peu de science éloigne de Dieu, beaucoup de science y ramène

Louis Pasteur

RESUMO

A obesidade e o excesso de peso são considerados uma pandemia em crescimento. A obesidade gera distúrbios metabólicos sistêmicos e teciduais, como resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão e doenças cardiovasculares e renais. A doença renal crônica, que atinge 10% da população adulta, é relacionada com a obesidade, resistência à insulina e hipertensão e resulta em progressivo declínio da função renal com aumento da morbimortalidade. O óleo de peixe (OP), rico em lipídeos da família n-3, é considerado imunomodulador e protetor em algumas patologias metabólicas e renais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a função renal em modelo de obesidade e o efeito da suplementação com OP sobre estes parâmetros. No estudo foram utilizados camundongos Swiss (6 semanas) que consumiram por 8 semanas ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) ou ração padrão (S) (76, 26 e 63% de carboidratos; 15, 15 e 26% de proteínas; 10, 59 e 11% de lipídeos, respectivamente). A indução do modelo foi avaliada acompanhando o ganho de peso e a intolerância à glicose pelo teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTIG) e área sob a curva (AUC) do TTIG. Após a indução, os animais de cada grupo foram distribuídos em três grupos: sem suplementação (S, HC e HF) e suplementados via oral por 4 semanas (1g/kg p.c.) com OP (SOP, HCOP e HFOP) ou óleo de girassol (OG) (SOG, HCOG e HFOG). No período de indução, a dieta HF gerou aumento da intolerância à glicose e do ganho de peso (vs S e HC). A dieta HC elevou algumas glicemias do TTIG, sem alterar a AUC, mas elevou o peso corporal (vs S). Após as suplementações, HC e HF elevaram o peso dos tecidos adiposos, as concentrações plasmáticas de HDL, colesterol total e glicose em jejum e reduziram o peso do rim. A insulinemia foi maior no grupo HFOP vs SOP e HCOP e o ganho de peso elevou-se no grupo HCOP vs SOP. A dieta HF ainda gerou maior peso final (vs S). O OP reduziu a glicemia em jejum (HCOP) e os níveis de colesterol total (HCOP e HFOP). O OG elevou a insulinemia (HFOG e SOG) e o colesterol total (SOG). As dietas HC e HF reduziram a filtração glomerular, fluxo urinário e a uremia. A dieta HC reduziu a osmolalidade urinária e plasmática e elevou a excreção urinária de proteínas totais. A dieta HF reduziu a osmolalidade urinária, efeito revertido pelo OP. As duas dietas aumentaram o *clearance* de água livre, reduziram a excreção urinária de TXB_2 , sem afetar PGE_2 . A dieta HF alterou o manejo tubular de sódio, com redução da fração de excreção de Na^+ . Esta dieta elevou também a albuminúria e a concentração de $\text{TNF-}\alpha$ renal e reduziu a expressão proteica de COX-2, entretanto a dieta HC aumentou a de AMPK. As dietas HC e HF alteraram marcadores morfológicos renais, onde: HC aumentou marcação de vimentina e de PCNA no interstício e a HF elevou a marcação de vimentina tubulointersticial. O OP (HFOP) reduziu a marcação de vimentina nos túbulos, de pJNK nos glomérulos e de α -SMA glomerular e tubulointersticial, ainda, elevou a adiponectinemia com redução da de $\text{TNF-}\alpha$ no plasma e rim, além dos grupos com OP apresentaram maior incorporação de lipídeos n-3 no tecido renal (vs S, HC e HF) em detrimento dos n-6. Assim, a dieta HF gerou um modelo de obesidade de forma mais eficaz que a HC, as duas induziram modificações metabólicas e renais, mas a HF foi mais expressiva. O OP atuou com efeito anti-inflamatório sistêmico e renal, revertendo parcialmente às alterações geradas pelo modelo.

Palavras-chaves: obesidade, doença renal crônica, função renal, óleo de peixe.

ABSTRACT

Obesity and overweight are considered a pandemic growing. Obesity induce metabolic and tecidual disorders, as insulin resistance, dyslipidemia, hypertension, cardiovascular and renal disease. Chronic kidney disease is present in 10% adult population and is related with obesity, insulin resistance and hypertension, resulting in progressive decline of renal function, with increased morbidity and mortality rate. Fish oil (OP), rich in n-3 lipids, acts as an immunomodulator and has protective effect againsts metabolic and renal pathologies. The objective of this work was evaluated renal function in an obesity model and the effect of OP supplementation on these parameters. In the study were used Swiss mice (6 weeks old) that consumed for 8 weeks high carbohydrate (HC) or high fat (HF) diets or standard (S) chow (76, 26 and 63% carbohydrate; 15, 15 and 26% protein; 10, 59 and 11% lipids, respectively). The induction of the model was assessed by monitoring weight gain and glucose intolerance by the intraperitoneal glucose tolerance test (TTIG) and area under curve (AUC) from TTIG. After the induction time, animals were divided in three groups: without supplementation (S, HC, HF), supplemented (1g/kg body weight) for 4 weeks with OP (SOP, HCOP and HFOP) or sunflower oil (OG) (SOG, HCOG and HFOG). During the induction time, HF diet increased glucose intolerance and weight gain (vs S and HC). HC diet rised glycemia in some times of TTIG, without modification in AUC, but increased body weight (vs S). After supplementation, HC and HF diets increased adipose tissue weight, plasma HDL, total cholesterol, fasting glucose concentrations and reduced kidney weight. Plasma insulin was higher in HFOP than SOP and HCOP groups, and HCOP rised weight gain versus SOP. HF diet rised final body weight in relation S group. OP was capable to reduce fasting glucose (HCOP) and plasma total cholesterol (HCOP and HFOP). OG increased plasma insulin (HFOG and SOG) and total cholesterol (SOG). HC and HF diet decreased glomerular filtration, urinary flow, and plasma urea. HC diet increased urinary excretion of total protein, and decreased urinary and plasmatic osmolality. HF diet reduced urinary osmolality, which was altered by OP. Modified diets rised free water clearance, decreased urinary TXB₂ excretion and not affected PGE₂ excretion. HF diet altered tubular handling of sodium, with a reduction of sodium excretion. This diet induced also an increase of urinary excretion of albumin and renal TNF- α concentration. HC and HF diets modified renal morphological markers, HC increased positive cell for vimentin and PCNA in interstitium, and HF rised positive cell for vimentin in tubular cell and interstitium. Fish oil (HFOP) was able to reduce positive tubular cell for vimentin, glomerular score for pJNK and glomerular and tubulointerstitial score for α -SMA, and increased plasma adiponectin, with decreased in plasma and renal TNF- α concentration, in addition, fish oil groups presented high n-3 lipids incorporation in renal tissue (vs S, HC and HF) with low n-6 lipids. Thereby, HF diet induced an obesity model more effectively than HC diet, both induced metabolic and renal modification, but HF diet caused most significant changes. Fish oil acted with antiinflammatory effect in systemic and renal tissue, partially reversing the changes generated by the model.

Key-words: obesity, chronic kidney disease, renal function, fish oil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 Eventos patofisiológicos implicados entre a obesidade e o desenvolvimento de hipertensão e doenças cardiovasculares. AGL, ácidos graxos livres; IL, interleucina; SRAA, sistema renina-angiotensina-aldosterona; SNS, sistema nervoso simpático, TNF- α , fator de necrose tumoral- α (modificado de KURUKULASURIYA *et al.*, 2011). 16
- FIGURA 2 Resumo do mecanismo de indução da hipertensão e da injúria renal pela obesidade via ativação do sistema nervoso simpático, do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), pela compressão física nos rins e anormalidades metabólicas (modificado de HALL *et al.*, 2004). 28
- FIGURA 3 Design experimental da formação dos três grupos com dietas modificadas no período de indução do modelo experimental. Os grupos permaneceram consumindo as respectivas rações descritas por oito semanas. 41
- FIGURA 4 Design experimental da formação dos nove grupos com dietas modificadas e com associação com as suplementações de óleo de peixe ou óleo de girassol por quatro semanas. Permanecendo os seguintes grupos: com ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG), e com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com as mesmas suplementações (HCOP, HCOG e HFOP, HFOG). 44
- FIGURA 5 Curva glicêmica (mg/dL) vs tempo (min) a partir do teste de tolerância intraperitoneal à glicose realizado após 8 semanas de dieta dos grupos ração padrão (S) (n=32), com ração rica em carboidrato (HC) (n=32) e em lipídeos (HF) (n=56). Dados expressos em média \pm EPM. a $p < 0,0001$ vs S; b $p < 0,001$ vs S; c $p < 0,001$ vs HC; d $p < 0,0001$ vs HC; e $p < 0,05$ vs S (realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey). 59
- FIGURA 6 Área sob a curva (AUC – area under curve) a partir da Curva glicêmica (mg/dL) vs tempo (min) do teste de tolerância intraperitoneal à glicose realizado após 8 semanas de dieta dos grupos ração padrão (S) (n=31), com ração rica em carboidrato (HC) (n=27) e em lipídeos (HF) (n=37). Dados expressos em média \pm EPM. a $p < 0,0001$ vs S; b $p < 0,0001$ vs HC (realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey). 60
- FIGURA 7 Curva glicêmica (mg/dL) vs tempo (min) a partir do teste de tolerância intraperitoneal à glicose realizado após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG) (A), com ração rica em carboidrato (HC) (n=10) e suas suplementações (HCOP e HCOG) (B) e ração rica em lipídeos (HF) e com as mesmas suplementações (HFOP e HFOG) (C). Dados expressos em média \pm EPM. 65

- FIGURA 8 Área sob a curva (AUC – area under curve) a partir da curva glicêmica (mg/dL) vs tempo (min) do teste de tolerância intraperitoneal à glicose realizado após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=13) com óleo de peixe (SOP) (n=9) ou óleo de girassol (SOG) (n=10), e com ração rica em carboidrato (HC) (n=10) ou em lipídeos (HF) (n=15) com as mesmas suplementações [HCOP (n=12), HCOG (n=9) e HFOP (n=11), HFOG (n=11)]. Dados expressos em média \pm EPM. a $p<0,01$ vs S; b $p<0,0001$ vs S; c $p<0,0001$ vs HC; d $p<0,0001$ vs SOP; e $p<0,0001$ vs HCOP; f $p<0,05$ vs SOG; g $p<0,05$ vs HCOG; h $p<0,01$ vs HF (a, b, c, d, e realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey; f, g teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn). 67
- FIGURA 9 Insulinemia dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=7), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=7) ou óleo de girassol (SOG) (n=10), e com ração rica em carboidrato (HC) (n=10) ou em lipídeos (HF) (n=11) e com as mesmas suplementações [HCOP (n=9), HCOG (n=10) e HFOP (n=10), HFOG (n=10)]. Dados expressos em média \pm EPM. a $p<0,05$ vs S; b $p<0,01$ vs HF; c $p<0,05$ vs SOP; d $p<0,05$ vs HCOP; e $p<0,01$ vs SOG; f $p<0,05$ vs HCOG. (a, e, f foram analisados por teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn; b, c, d por análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey). 68
- FIGURA 10 Clearance de creatinina (mL/min/kg p.c.) dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=20), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=19) ou óleo de girassol (SOG) (n=10), e com ração rica em carboidrato (HC) (n=26) ou em lipídeos (HF) (n=31) e com as mesmas suplementações [HCOP (n=28), HCOG (n=22) e HFOP (n=28), HFOG (n=20)]. Dados expressos em média \pm EPM. a $p<0,05$ vs S; b $p<0,05$ vs SOP (a análise feita por teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn; b realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey). 74
- FIGURA 11 Excreção urinária de prostaglandina (PG) E₂ (A) e de tromboxano (TX) B₂ dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=10), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=11), com ração rica em carboidrato (HC) (n=12) ou em lipídeos (HF) (n=10) e com as suplementações [HCOP (n=9) e HFOP (n=9)]. Dados expressos em média \pm EPM. a $p<0,001$ vs S; b $p<0,01$ vs S; c $p<0,05$ vs SOP. Realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey. 81
- FIGURA 12 Concentração plasmática de TNF- α (pg/mL) (A) e adiponectina (B) dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP), com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com as suplementações (HCOP e HFOP). Dados expressos em média \pm EPM. a $p<0,05$ vs SOP; b $p<0,05$ vs HF; c $p<0,01$ vs SOP (a, b, c realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey). 82

- FIGURA 13 Concentração de TNF- α no tecido renal normalizado pela concentração de proteína (pg/g de proteína) dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=13), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=13), com ração rica em carboidrato (HC) (n=13) ou em lipídeos (HF) (n=13) e com as suplementações [HCOP (n=12) e HFOP (n=13)]. Dados expressos em média \pm EPM. a $p<0,0001$ vs S; b $p<0,0001$ vs HC; c $p<0,001$ vs SOP; d $p<0,01$ vs SOP; e $p<0,0001$ vs HCOP; f $p<0,0001$ vs HF (a, b, c, d, e realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey; f realizado teste t não pareado). 83
- FIGURA 14 Razão da excreção urinária de albumina normalizado pela concentração urinária de creatinina (ng/mg) dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=6), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=6), com ração rica em carboidrato (HC) (n=6) ou em lipídeos (HF) (n=7) e com as suplementações [HCOP (n=6) e HFOP (n=7)]. Dados expressos em média \pm EPM. a $p<0,01$ vs S (análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey). 84
- FIGURA 15 Imunolocalização para α -SMA (*smooth muscle actin*) analisado por score por glomérulo (A) e por campo tubulointersticial ($0,245\text{mm}^2$) (B). Imagens representativas dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=6) (C), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=6) (D), com ração rica em carboidrato (HC) (n=6) (E), com suplementação com óleo de peixe (HCOP) (n=6) (F) e com ração rica em lipídeos (HF) (n=6) (G), com a suplementação (HFOP) (n=6) (H). Dados expressos em média \pm EPM. a $p<0,0001$ vs SOP; b $p<0,001$ vs HCOP; c $p<0,05$ vs S; d $p<0,05$ vs HF (a, b realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey; c, d realizado teste t não pareado). 85
- FIGURA 16 Imunolocalização para vimentina analisado por células positivas para vimentina por campo intersticial ($0,245\text{mm}^2$) (A) e por campo tubular ($0,245\text{mm}^2$) (B). Imagens representativas dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=8) (C), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=8) (D), com ração rica em carboidrato (HC) (n=7) (E), com suplementação com óleo de peixe (HCOP) (n=8) (F) e com ração rica em lipídeos (HF) (n=8) (G), com a suplementação (HFOP) (n=8) (H). Dados expressos em média \pm EPM. a $p<0,001$ vs S; b $p<0,05$ vs S; c $p<0,01$ vs SOP; d $p<0,01$ vs HF (a, b, c realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey; d realizado teste t não pareado). 87
- FIGURA 17 Imunolocalização para PCNA (*proliferation cell nuclear antigen*) analisado por células positivas para PCNA por glomérulo (A) e por campo tubulointersticial ($0,245\text{mm}^2$) (B). Imagens representativas dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=6) (C), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=5) (D), com ração rica em carboidrato (HC) (n=6) (E), com suplementação com óleo de peixe (HCOP) (n=5) (F) e com ração rica em lipídeos (HF) (n=6) (G), com a suplementação

(HFOP) (n=6) (H). Dados expressos em média \pm EPM. a $p<0,01$ vs S; b $p<0,01$ vs SOP (a, b realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey). 88

FIGURA 18 Imunolocalização para desmina analisado por *score* por glomérulo (A). Imagens representativas dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=6) (B), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=6) (C), com ração rica em carboidrato (HC) (n=5) (D), com suplementação com óleo de peixe (HCOP) (n=5) (E) e com ração rica em lipídeos (HF) (n=6) (F), com a suplementação (HFOP) (n=5) (G). Dados expressos em média \pm EPM. a $p<0,01$ vs SOP (a realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey). 89

FIGURA 19 Imunolocalização para pJNK (c-jun cinase N-terminal) analisado por células positivas para pJNK por glomérulo (A) e por campo tubulointerstitial ($0,245\text{mm}^2$) (B). Imagens representativas dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=6) (C), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=6) (D), com ração rica em carboidrato (HC) (n=6) (E), com suplementação com óleo de peixe (HCOP) (n=6) (F) e com ração rica em lipídeos (HF) (n=6) (G), com a suplementação (HFOP) (n=5) (H). Dados expressos em média \pm EPM. a $p<0,01$ vs HF (a realizado teste t não pareado). 90

FIGURA 20 Expressão protéica de AMPK- $\alpha 1$ normalizada por expressão protéica de β -actina dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=11), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=8), com ração rica em carboidrato (HC) (n=7), com suplementação com óleo de peixe (HCOP) (n=6) e com ração rica em lipídeos (HF) (n=9), com a suplementação (HFOP) (n=6). Dados expressos em média \pm EPM. a $p<0,05$ vs S (realizado teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn). 92

FIGURA 21 Expressão protéica de COX-2 normalizada por expressão protéica de β -actina dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=6), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=5), com ração rica em carboidrato (HC) (n=5), com suplementação com óleo de peixe (HCOP) (n=3) e com ração rica em lipídeos (HF) (n=4), com a suplementação (HFOP) (n=3). Dados expressos em média \pm EPM. a $p<0,05$ vs S (realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey). 92

FIGURA 22 Expressão protéica da unidade p65 do fator nuclear κB (NF- κB) normalizada por expressão protéica de β -actina dos animais após 4 semanas de suplementação nos grupos ração padrão (S) (n=8), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=7), com ração rica em carboidrato (HC) (n=6), com suplementação com óleo de peixe (HCOP) (n=6) e com ração rica em lipídeos (HF) (n=7), com a suplementação (HFOP) (n=6). Dados expressos em média \pm EPM. 93

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Composição das dietas rica em carboidrato (HC) e em lipídeos (HF), em g/kg.	42
TABELA 2	Conteúdo calórico das dietas <i>standard</i> , rica em carboidrato e rica em lipídeos (kcal%).	42
TABELA 3	Curva glicêmica (mg/dL) vs tempo (min) a partir do teste de tolerância intraperitoneal à glicose realizado após 8 semanas de dieta dos grupos ração padrão (S) (n=32), com ração rica em carboidrato (HC) (n=32) e em lipídeos (HF) (n=56). Dados expressos em média \pm EPM.	59
TABELA 4	Peso inicial (g), final (g) e porcentagem de ganho de peso em relação ao peso inicial e média do consumo diário de ração por animal em gramas e em kcal durante as 8 semanas das dietas nos grupos ração padrão (S), ração rica em carboidrato (HC) e rica em lipídeos (HF).	61
TABELA 5	Peso inicial (g), final (g) e porcentagem de ganho de peso em relação ao peso inicial durante 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG), e com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com as mesmas suplementações (HCOP, HCOG e HFOP, HFOG).	63
TABELA 6	Curva glicêmica (mg/dL) vs tempo (min) a partir do teste de tolerância intraperitoneal à glicose realizado após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG), e com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com as mesmas suplementações (HCOP, HCOG e HFOP, HFOG).	66
TABELA 7	Peso do rim (g), relação peso do rim pelo comprimento da tíbia (g/mm), peso dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal e o índice de adiposidade após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG), e com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com as mesmas suplementações (HCOP, HCOG e HFOP, HFOG).	69
TABELA 8	Glicemia em jejum (mg/dL) e triacilgliceróis (mg/dL), colesterol total (mg/dL), LDL - colesterol (mg/dL) e HDL - colesterol (mg/dL) plasmáticos após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG), e com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com as mesmas suplementações (HCOP, HCOG e HFOP, HFOG).	72
TABELA 9	Proteinemia (g/dL), concentração de uréia (mg/dL) e creatinina plasmática (mg/dL) e excreção urinária de proteínas totais normalizada pela	

concentração urinária de creatinina (mg/mg) após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG), e com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com as mesmas suplementações (HCOP, HCOG e HFOP, HFOG)..... 75

TABELA 10 Concentrações plasmáticas (mEq/dL) e carga excretada (μ Eq/min) de Na^+ e K^+ e fração de excreção (FE) (%) de Na^+ após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG), e com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com as mesmas suplementações (HCOP, HCOG e HFOP, HFOG)..... 77

TABELA 11 Clearance de lítio (C_{Li}) e a Excreção Pós-Proximal Fracional de Na^+ ($\text{EPPF}_{\text{Na}^+}$) (%) após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP), e com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com a mesma suplementação (HCOP e HFOP). 78

TABELA 12 Osmolalidade plasmática (mOsm/kg H_2O), osmolalidade urinária (mOsm/kg H_2O), *clearance* de H_2O livre (mL/min) e fluxo urinário (mL/min) após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG), e com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com as mesmas suplementações (HCOP, HCOG e HFOP, HFOG). 79

TABELA 13 Perfil de ácidos graxos no tecido renal dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=7), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=7), com ração rica em carboidrato (HC) (n=6), com suplementação com óleo de peixe (HCOP) (n=6) e com ração rica em lipídeos (HF) (n=7), com a suplementação (HFOP) (n=7). 95

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α -SMA	α -smooth muscle actin (α -actina de musculatura lisa)
AA	Ácido araquidônico
AG	Ácido graxo
AGE	Advanced glycation end products (produtos finais de glicação avançada)
AGL	Ácidos graxos livres
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
AL	Ácido linoléico
ALA	Ácido α -linolênico
AMPc	Cyclic adenosin monophosphate (adenosina monofosfato cíclico)
AMPK	Adenosin monophosphate kinase (adenosina monofosfato cinase)
AUC	Area under curve (área sob a curva)
C _{Cr}	Clearance de creatinina
C _{H₂O}	Clearance de água livre
C _{Li}	Clearance de lítio
C _{Na}	Clearance de sódio
C _{osm}	Clearance osmolar
CF _{Na⁺}	Carga filtrada de Na ⁺
COX	Ciclooxigenase
DD _{Na⁺}	Distal delivery de sódio
DHA	Ácido docosahexaenóico
DPA	Ácido docosapentaenóico
DRC	Doença renal crônica
EP	Receptor prostanóides E
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EPF _{Na⁺}	Excreção pós-proximal fracional de sódio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FE	Fração de excreção
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HC	Grupo que recebeu dieta rica em carboidrato

HCOG	Grupo que recebeu dieta rica em carboidrato e suplementação com óleo de girassol
HCOP	Grupo que recebeu dieta rica em carboidrato e suplementação com óleo de peixe
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HF	Grupo que recebeu dieta rica em lipídeos
HFD	Dieta hiperlipídica
HFOG	Grupo que recebeu dieta rica em lipídeos e suplementação com óleo de girassol
HFOP	Grupo que recebeu dieta rica em lipídeos e suplementação com óleo de peixe
HETE	Ácido hidroxieicosatetraenóico
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i> (molécula de adesão intercelular)
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor-I</i> (fator de crescimento semelhante à insulina)
IL	Interleucina
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i> (substrato do receptor de insulina)
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i> (c-jun cinase N-terminal)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeos
LT	Leucotrieno
M _a	Peso do animal (kg)
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i> (proteínas cinases ativadas por mitógenos)
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein</i> (proteína quimioatraente de monócito)
n-3	Ácidos graxos ômega 3
n-6	Ácidos graxos ômega 6
n-9	Ácidos graxos ômega 9

NADPH	Adenina nicotinamida fosfato de dinucleotídeo
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa B</i> (fator de transcrição nuclear kappa B)
NO	Óxido nítrico
OP	Óleo de peixe
P _{cr}	Concentração plasmática de creatinina (mg/dL)
P _{ion}	Concentração plasmática de Na ⁺ ou K ⁺ (mEq/L)
P _{Li}	Concentração plasmática lítio (mEq/L)
P _{osm}	Osmolalidade plasmática (mOsm/L)
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular (<i>Proliferation cell nuclear antigen</i>)
PG	Prostaglandina
pJNK	<i>phospho c-jun N-terminal kinase</i> (c-jun cinase N-terminal fosforilada)
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> (receptores ativados por proliferador de peroxissomo)
S	Grupo que recebeu dieta <i>standard</i>
SNS	Sistema nervoso simpático
SOG	Grupo que recebeu dieta <i>standard</i> e suplementação com óleo de girassol
SOP	Grupo que recebeu dieta <i>standard</i> e suplementação com óleo de peixe
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
SREBP	<i>Sterol element-binding proteins</i> (proteínas ligadoras aos elementos regulatórios de esteróis)
TA	Tecido adiposo
TAG	Triacilgliceróis
TEM	Transição epitelial-mesenquimal
TFG	Taxa de filtração glomerular
TGF	<i>Transforming growth factor</i> (fator de crescimento transformador)
TNF	Fator de necrose tumoral
TTIG	Teste de tolerância intraperitoneal à glicose
TX	Tromboxano
U _{cr}	Concentração urinária creatinina (mg/dL)

U_{ion}	Concentração urinária de Na^+ ou K^+ (mEq/L)
U_{osm}	Osmolalidade da urina (mOsm/L)
V_u	Volume urinário por minuto (mL/min)
VCAM	<i>Vascular cell adhesion</i> (molécula de adesão da célula vascular)
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBESIDADE	13
1.2 OBESIDADE E DOENÇA RENAL CRÔNICA	16
1.3 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS	29
2 JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 ANIMAIS	41
4.2 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL	43
4.3 SUPLEMENTAÇÕES COM ÓLEO DE PEIXE E ÓLEO DE GIRASSOL	43
4.4 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL	45
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE PLASMÁTICA	48
4.7 EXCREÇÃO URINÁRIA DE PROSTAGLANDINA E ₂ , TROMBOXANO B ₂ E ALBUMINA	49
4.8 DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ADIPONECTINA, DE FATOR DE NECROSE TUMORAL- α (TNF- α) E DE INSULINA	49
4.9 DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO RENAL DE TNF- α	50
4.10 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (<i>HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY</i> – HPLC)	50
4.11 IMUNOHISTOQUÍMICA	52
4.12 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTÉICA (<i>WESTERN BLOTTING</i>)	54
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
5 RESULTADOS	58
5.1 INDUÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL	58
5.2 RESULTADOS APÓS SUPLEMENTAÇÃO	62
6 DISCUSSÃO	96
6.1 OBESIDADE E RESISTÊNCIA INSULINA INDUZIDA PELA DIETA	96
6.2 PAPEL DAS SUPLEMENTAÇÕES NO MODELO EXPERIMENTAL	101
7 CONCLUSÃO	133
REFERÊNCIAS	135
ANEXO	146

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE

O excesso de peso e a obesidade são considerados uma pandemia em crescimento afetando aproximadamente 1,1 bilhões de adultos, com um aumento ainda maior de sua incidência em crianças. No Brasil, de acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009, realizada pelo IBGE e o Ministério de Saúde, a obesidade e o excesso de peso também vem aumentando rapidamente nos últimos anos em todas as faixas etárias. A partir deste estudo, 50% dos homens e 48% das mulheres apresentaram excesso de peso, sendo que 12,5% dos homens e 16,9% das mulheres se encontraram com obesidade. Na população infantil, o excesso de peso foi encontrado em um terço das meninas e meninos, valor oito vezes maior que a frequência de déficit de peso. A obesidade se apresenta em 14% das crianças, sendo aproximadamente em 16% nos meninos e 12% nas meninas (ABESO, 2010; IBGE, 2010; KOPPLE; FERROZE, 2011).

Na maior parte dos países, o aumento da prevalência da obesidade é primeiramente motivado pela ingestão alimentar aumentada em quantidade e em energia juntamente com redução de atividade física regular, gerando assim, a principal causa de morbi-mortalidade a partir de doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus*, como em outras doenças (KOPPLE; FERROZE, 2011).

A obesidade gera um quadro inflamatório sistêmico de baixo grau, que inicia uma cascata de desordens incluindo resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia, aterosclerose, hipertensão, microalbuminúria, onde se aumenta o risco de doenças cardiovasculares. Este grupo de desordens são frequentemente referidas como “síndrome metabólica” ou “síndrome X”, sendo o excesso de ganho de peso a primeira causa presente na maioria dos pacientes. Além disso, torna-se aumentado o risco de outras doenças, como esteatose hepática não-alcoólica, câncer e síndrome do

ovário policístico (HALL *et al.*, 2004; BRUCE; HANSON, 2010; DECLÈVES *et al.*, 2011; BÖRGESON; SHARMA, 2013; SIMOPOULOS, 2013).

A síndrome metabólica foi primeiramente descrita como “síndrome de resistência à insulina”, já que nos casos iniciais eram relatados quadros de intolerância à glicose e hiperinsulinemia, além de alteração do perfil lipídico e hipertensão. É caracterizada por um estado metabólico onde a insulina presente em concentrações fisiológicas falha em responder ao processo biológico normal, sendo, então, o cerne da síndrome metabólica. A resistência à insulina é normalmente associada à obesidade, na maior parte dos casos, mas também acompanha pacientes com intolerância à glicose, diabetes tipo 2 e encontra-se em 25% dos pacientes não obesos com tolerância normal à glicose (BRUCE; HANSON, 2010; SIMOPOULOS, 2013). Assim, é considerada a resistência à insulina o fator de maior importância na doença arterial coronária, hipertensão e diabetes tipo 2.

Modelos animais para indução da obesidade utilizam-se do consumo de dieta hiperlipídica para mimetizar o excesso de consumo de alimentos calóricos que ocorre com os humanos, juntamente com a baixa atividade física. Em estudo de DEJI e colaboradores (2009) o consumo de dieta hiperlipídica (HFD) por camundongos C57BL/6 proporcionou aos animais alterações sistêmicas compatíveis com a síndrome metabólica em humanos, incluindo obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertriacilglicerolemia e hipertensão. Além de alterações metabólicas, em estudo de HENEGAR *et al.* (2001) com cachorros, foi verificado que o consumo de dieta hiperlipídica por 7 e 9 semanas foi capaz de gerar ainda modificações histológicas, bioquímicas e funcionais nos rins destes animais. Dentre estas modificações, foram encontradas: expansão na cápsula de Bowman's, proliferação celular e aumento da matriz mesangial nos glomérulos, aumento do fluxo plasmático renal, entre outras.

Outras formas de induzir a obesidade estão sendo descritas via indução do quadro inicial de resistência à insulina associada à dislipidemia. Este modelo de obesidade seria pelo consumo de dietas ricas em carboidratos, principalmente açúcares simples como a frutose. Presente em diversos alimentos processados, bebidas e sobremesas, o consumo de frutose gera um importante mecanismo lipogênico “de novo”, onde há síntese do ácido graxo palmitato, um lipídeo saturado, a partir de

glicose, frutose ou ambos. O aumento da lipogênese eleva as concentrações de triacilgliceróis e as de lipoproteína de baixa densidade (LDL – *low density lipoprotein*) e redução de lipoproteína de alta densidade (HDL – *high density lipoprotein*), o que acelera a aterosclerose, contribui para inflamação sistêmica, acúmulo de lipídeos no fígado, estresse oxidativo, hipertensão, intolerância à glicose e resistência à insulina (SIMOPOULOS, 2013).

Estudos epidemiológicos demonstram que o excesso de peso é a causa mais comum do desenvolvimento da hipertensão essencial. Diversos mecanismos estão envolvidos na geração da hipertensão a partir da obesidade como a hiperreninemia, hiperaldosteronismo, hiperinsulinemia, ativação do sistema nervoso simpático, inflamação, estresse oxidativo e alteração de perfil de citocinas e adipocinas secretadas, todos estes, estão presentes na maioria dos casos de obesidade, como mostrado na FIGURA 1. Em contrapartida, o tratamento da obesidade com dieta e exercícios físicos, levando à perda de peso, reduz a pressão arterial em pacientes obesos hipertensos (HALL *et al.*, 2004; KOPPLE; FEROZE, 2011; KURUKULASURIYA *et al.*, 2011).

A obesidade é também um fator de risco para doença renal crônica, mesmo excluindo variáveis como diabetes e hipertensão. Além disso, a distribuição do tecido adiposo no organismo é mais importante no desenvolvimento de outras doenças relacionadas à obesidade do que somente a presença de obesidade, ou seja, a obesidade central e visceral parece ser o maior mediador das doenças (BÖRGESON; SHARMA, 2013).

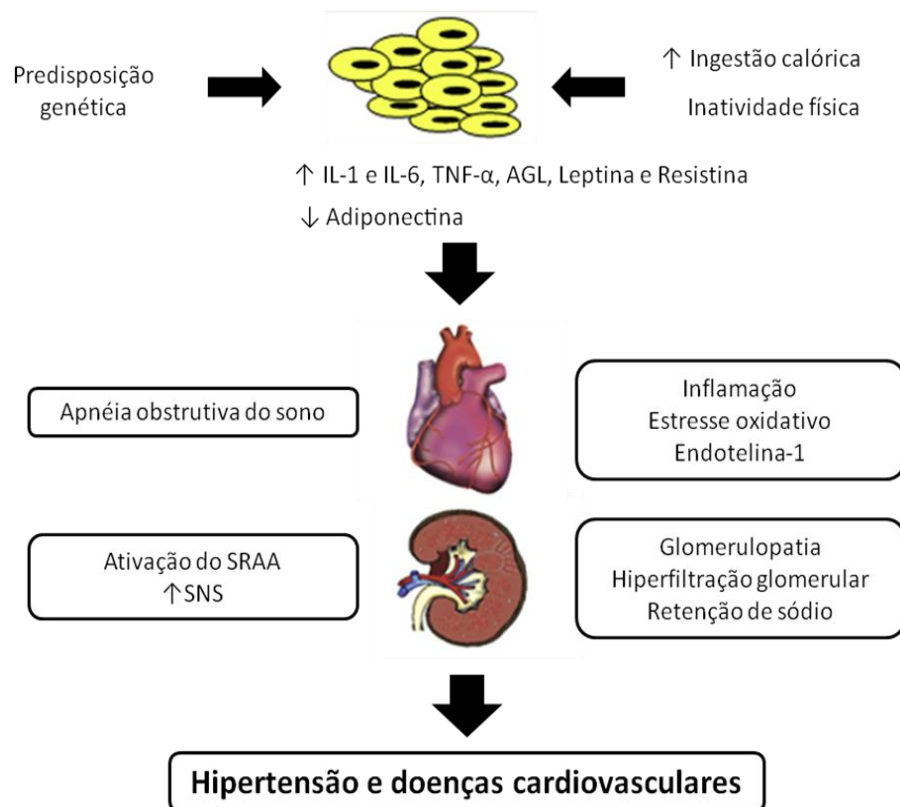


FIGURA 1 Eventos patofisiológicos implicados entre a obesidade e o desenvolvimento de hipertensão e doenças cardiovasculares. AGL, ácidos graxos livres; IL, interleucina; SRAA, sistema renina-angiotensina-aldosterona; SNS, sistema nervoso simpático, TNF- α , fator de necrose tumoral- α (modificado de KURUKULASURIYA *et al.*, 2011).

1.2 OBESIDADE E DOENÇA RENAL CRÔNICA

1.2.1 Etiologia e fisiopatologia da Doença Renal Crônica

Doença renal crônica (DRC) é uma desordem que afeta aproximadamente 10% da população adulta em todo o mundo. É caracterizada por incluir condições que afetam os rins, com potencial causa para progressiva redução da função renal e seu diagnóstico é feito pela presença desta perda de função por 3 meses ou mais, independente da causa. Podem apresentar anormalidades na estrutura ou somente na função renal. É considerada um dos maiores problemas de saúde pública por predispor

não somente ao desenvolvimento de falência renal de estágio final irreversível com a necessidade de terapia renal substitutiva, mas também leva ao aumento da taxa de mortalidade por diferentes causas, particularmente doenças cardio- e cerebrovasculares (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002; KOPPLE, 2010; TESAURO *et al.*, 2012; BÖRGESON; SHARMA, 2013).

Durante o desenvolvimento da doença, o paciente renal crônico pode ser classificado em estágios de DRC, com a avaliação pela taxa de filtração glomerular e proteinúria. Os estágios vão de 1 a 5, sendo que o estágio 5 seriam pacientes que necessitam de terapia renal substitutiva, como a diálise. De acordo com a Sociedade Brasileira de Nefrologia estimam que a partir censo do ano de 2012 quase 100 mil brasileiros realizavam tratamento dialítico por ano (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002; TESAURO *et al.*, 2012; SBN, 2012).

A incidência e prevalência da DRC estão crescendo, por diversas causas, como o aumento da longevidade da população que permite o desenvolvimento de progressiva doença renal. Diversos elementos contribuem para o início e progressão do dano crônico nos rins, incluindo suscetibilidade e fatores que desencadeiam o início e/ou a progressão da doença. Dentre a suscetibilidade, teríamos a idade, história familiar, reduzida massa de néfrons e baixo peso ao nascer. Entretanto, as maiores causas do aumento da incidência da DRC são o excesso de peso, obesidade, hipertensão e o diabetes (KOPPLER, 2010; TESAURO *et al.*, 2012).

O principal marcador para lesão renal é o persistente aumento da excreção de proteínas na urina. A excreção de um tipo de proteína específica como a albumina ou outras globulinas de menor peso molecular, depende do tipo de doença renal presente. O aumento da excreção de albumina é um marcador sensível para doença renal com etiologia na diabetes, doença glomerular ou hipertensão. O termo “proteinúria” seria a caracterização da excreção de albumina, outras proteínas inespecíficas ou proteínas totais, já a “albuminúria” se refere especificadamente o aumento da excreção da albumina. A “microalbuminúria”, então, é definida como a presença de albumina em concentrações mínimas detectáveis nas metodologias presentes: 30-300mg de albumina em urina de 24h (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002; GOVINDARAJAN *et al.*, 2005).

1.2.2 Obesidade e Doença Renal Crônica

Considerando que o excesso de peso é uma das principais causas para o desenvolvimento da hipertensão e diabetes tipo 2, e estas últimas juntas, somam aproximadamente 70% dos casos de doença renal de estágio final, sugere-se, então, que o conceito de síndrome metabólica seja expandido para incluir fatores de risco cardiovasculares, principalmente fatores de risco que englobam inflamação, doença renal crônica ou doença cardiovascular, considerados então, a síndrome cardiometabólica (HALL *et al.*, 2004; GOVINDARAJAN, *et al.*, 2005; EJERBLAD *et al.*, 2006; DECLÈVES *et al.*, 2011; KOPPLE; FERROZE, 2011).

A síndrome cardiometabólica envolve fatores de risco metabólicos e cardiovasculares, como a obesidade central, hipertensão, resistência à insulina, dislipidemia, microalbuminúria e hipercoagulabilidade. Estes fatores de risco aumentam ainda mais o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como falência cardíaca congestiva e doença renal crônica, além de aumentar a mortalidade como um todo (GOVINDARANJAN *et al.*, 2005).

A obesidade, então, contribui indiretamente para a DRC pela união entre diabetes, hipertensão e aterosclerose. Entretanto, a obesidade pode diretamente levar à DRC, é o caso de pacientes obesos, mas não diabéticos, onde a obesidade e, frequentemente o excesso de peso, são associados com modificações hemodinâmicas, fisiológicas, estruturais e patológicas nos rins. Dentre estas modificações, as alterações na hemodinâmica seriam: aumento do fluxo plasmático efetivo, na taxa de filtração glomerular e na fração de filtração. Histopatologicamente, as mudanças renais associadas com a obesidade são: aumento da área glomerular, aumento da matriz mesangial e da proliferação das células mesangiais, excreção de proteínas, redução do número e hipertrofia dos podócitos, aumento dos pedicelos, infiltração intersticial de leucócitos e acúmulo de matriz extracelular pró-fibrótica levando a glomeruloesclerose e fibrose túbulointestinal. A consequente perda de parênquima e progressão da doença é também induzida pela inflamação, resistência à insulina e estresse oxidativo (HALL *et*

al., 2004; EJERBLAD *et al.*, 2006; SCHLONDORFF, 2008; IX; SHARMA, 2010; KOPPLE; FEROZE, 2011; TESAURO *et al.*, 2012; BÖRGESON; SHARMA, 2013).

Os efeitos da obesidade na função e doença renal desde que foram identificados são alvos de vários estudos. Em 1923, foram reportadas evidências iniciais do papel da obesidade na albuminúria e pressão arterial no desenvolvimento da doença renal, e mais recentemente, foi considerado que o excesso de peso gera risco de mortalidade por si só e pelas doenças cardiovasculares (PREBLE, 1923; PAN *et al.*, 2006; EKNOYAN, 2011). A relação entre a obesidade e o desenvolvimento da proteinúria é tão forte que evidências sugerem que uma modesta perda de peso, de aproximadamente 5% do peso corporal, pode induzir a redução de mais de 30% na proteinúria em pacientes com perda da função renal. Estas evidências mostram que a perda de peso seria um potente tratamento antiproteinúrico evitando a progressão da DRC (PRAGA; MORALES, 2006).

A primeira complicação renal associada com a obesidade foi o carcinoma renal. Os mecanismos que interligam o risco de câncer renal e obesidade não estão claros, mas é proposto que a presença do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1 – *insulin-like growth factor-1*) em quantidades acima do normal em pacientes obesos poderia estimular a proliferação e inibir a apoptose das células do tecido renal. O excesso de calorias ingeridas também é capaz de aumentar a concentração de IGF-1. Outra hipótese é o aumento da peroxidação lipídica nas células renais de pacientes obesos. Os produtos da peroxidação lipídica podem agir diretamente no DNA das células renais, causando mutações, propiciando o desenvolvimento de tumores. Além disso, a hipertensão e o diabetes, gerados pela obesidade, também são fatores associados com aumento da incidência de carcinoma renal (PAN *et al.*, 2006).

1.2.3 Desenvolvimento da Doença Renal Crônica

Dentre as alterações geradas na DRC estão a esclerose glomerular e a fibrose tubulointersticial. A esclerose glomerular pode ser associada com ou sem inflamação e

componentes proliferativos. Já a progressiva fibrose tubulointersticial sempre está presente com inflamação persistente. A inflamação no tecido renal se inicia pela produção de mediadores químicos locais (quimocinas, citocinas e fatores de crescimento de origem lipídica, como prostanóides, leucotrienos, lipoxinas) em resposta ao estresse celular e injúria tecidual, resultando em infiltração de leucócitos, neutrófilos, macrófagos e células dentríticas, e secreção destes e outros mediadores químicos pelo infiltrado e por células derivadas da medula óssea, como células epiteliais tubulares e fibroblastos intersticiais. Estas ações conjuntas visam corrigir e reparar o dano tecidual local, mas resultam em ativação de células pró-fibróticas, predominantemente miofibroblastos com formação de cicatriz ou fibrose. A fibrose, então, é uma distorção de um processo celular de reparação que modifica a estrutura do néfron e inicia um ciclo vicioso que altera a homeostase celular. De uma forma geral, os fatores relacionados com o início da fibrose pelo estímulo tubular de secreção de mediadores inflamatórios seriam: hipóxia, isquemia, agentes infecciosos, lipídeos oxidados, alta concentração de glicose, proteinúria, ácido úrico, fatores genéticos, entre outros (ANDERS; VIELHAUDER; SCHLÖNDORFF, 2003; SCHLÖNDORFF, 2008; ALIKHAN; RICARDO, 2013).

Durante o desenvolvimento da fibrose renal, a infiltração de leucócitos induz a ativação de fibroblastos e fibrócitos com a deposição em excesso de matriz extracelular. O recrutamento tubulointersticial de leucócitos e sua ativação dependem de processos mediados por citocinas. Tanto células tubulares e glomerulares quanto fibroblastos intersticiais produzem citocinas pró-inflamatórias durante a hipóxia e a hiperglicemia. A ativação de fibroblastos estimula a secreção de citocinas como a proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1-*monocyte chemoattractant protein-1*) que pode atrair macrófagos para o local da injúria. Esta, como outras citocinas, são encontradas em biópsias de pacientes com nefropatia diabética. Sendo assim, com a infiltração de células como macrófagos e linfócitos há produção ainda maior de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas (TNF- α , interleucina-1 β) que contribuem para maior inflamação e desenvolvimento de doença renal (ANDERS; VIELHAUDER; SCHLÖNDORFF, 2003; PANZER *et al.*, 2006; SCHLÖNDORFF, 2008; DIAZ ENCARNACION *et al.*, 2011).

Alguns dos efeitos estimulantes para produção de citocinas no rim seriam lipopolissacarídeos (LPS), agregados de imunoglobulinas, LDL, interferon e adenosina monofosfato cíclico (AMPc – *cyclic adenosine monophosphate*). A expressão das citocinas, como o MCP-1, IL-1 β e TNF- α , a partir de um estímulo, como lesão isquêmica, tóxica ou inflamatória no tecido renal, é regulada transcricionalmente, onde o fator nuclear kappa B (NF- κ B – *nuclear factor kappa B*) aparece como um dos principais fatores nucleares de ativação transcricional de genes envolvidos em resposta imune e na inflamação e estresse oxidativo e é considerado o principal regulador da expressão de citocinas do tecido renal (PANZER *et al.*, 2006; ELMARAKBY; IMIG, 2010).

Sendo assim, podemos dividir a progressão da perda da função renal em algumas fases. A fase inicial é caracterizada pela injúria inicial com aumento de produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias gerando estímulo para infiltração de leucócitos. Após a fase inicial, teríamos a fase de amplificação, onde começa a aparecer alguma disfunção renal, com infiltração de leucócitos e fibrócitos, maior secreção de citocinas, proliferação e diferenciação de macrófagos, de células mesangiais e de fibroblastos, onde estas aumentam a produção de matriz extracelular e inicia-se um quadro leve de proteinúria. A partir deste momento, dois caminhos seriam possíveis: a fase de resolução ou a de progressão. A fase de resolução seria o término da injúria com restabelecimento da função renal normal. Já a de progressão apresentaria a progressiva perda de função renal, com aumento da injúria, hipóxia, maior produção de citocinas pró-inflamatórias e perdas estruturais irreversíveis. Com a fase de progressão instalada, por fim teríamos a fase terminal, onde há a presença da uremia, fibrose renal e hipóxia severa (ANDERS; VIELHAUDER; SCHLÖNDORFF, 2003).

1.2.4 Obesidade e Inflamação no desenvolvimento da Doença Renal Crônica

KNIGHT *et al.* (2010) desenvolveram um modelo animal de obesidade e hipertensão ao trabalhar com ratos espontaneamente hipertensos que receberam uma dieta hiperlipídica. Neste modelo foi observada a geração de um quadro inflamatório, com presença de citocinas pró-inflamatórias, como o MCP-1, e relação positiva entre a infiltração de macrófagos no tecido renal e o estresse oxidativo gerado pela hipertensão. O aumento da produção e circulação de ânion superóxido, uma das espécies reativas de oxigênio, induziu a ativação de NF- κ B, que aumentou a expressão de moléculas atraentes de leucócitos, como a molécula de adesão intercelular (ICAM – *intercellular adhesion molecule*) e de adesão da célula vascular (VCAM – *vascular cell adhesion molecule*), conduzindo ao que foi denominado de inflamação renal (KNIGHT *et al.*, 2010; ALIKHAN; RICARDO, 2013).

A inflamação sistêmica aparece associada com fatores de riscos metabólicos, na obesidade e em pacientes com aterosclerose e com doença renal crônica. A hipótese que inflamação pode causar danos renais seria pelo aumento da expressão de genes que regulam a expressão do receptor de LDL e outros genes que regulam o metabolismo lipídico e inflamatório, como para TNF- α e seu receptor, IL-6 e interferon γ , e genes relacionados com a resistência à insulina (transportador de glicose 1 e fator de crescimento vascular-endotelial) nos glomérulos de pacientes com nefropatia gerada pela obesidade (WU *et al.*, 2006).

As principais citocinas relacionadas com a doença renal crônica, como já citado, seriam a interleucina 6 e o TNF- α , sendo considerados os mais importantes marcadores de qualquer doença de caráter inflamatório. A IL-6 é um marcador de progressiva perda da função renal em pacientes com nefropatia por IgA e pode estar envolvida no dano renal na obesidade, uma condição caracterizada pelo aumento da concentração circulante desta citocina. Durante a injúria renal, a IL-6 aumenta a atividade do receptor para fator de crescimento transformador β 1 (TGF- β 1 – *transforming growth factor- β 1*) e por esta ação favorece o processo de fibrose tecidual. No tecido adiposo, o TNF- α é sintetizado tanto pelos adipócitos quanto pelos

macrófagos residentes e modula mecanismos diversos de sensibilização de insulina, como a inativação do receptor de insulina e de seu substrato, atuação na lipólise e na lipogênese. Há uma positiva correlação entre a concentração sérica de TNF- α com a pressão sanguínea sistólica e a resistência à insulina em paciente obesos. Nos rins, o TNF- α media a inflamação e a cicatrização em modelos de glomerulonefrite, na falência renal aguda por endotoxemia e na fibrose renal. Juntamente com a IL-6, o TNF- α apresenta efeitos tóxicos em células endoteliais, mesangiais e epiteliais renais e estão associados com o desenvolvimento da nefropatia pela síndrome metabólica e/ou obesidade no homem (ZOCCALI, 2009; ELMARAKBY; IMIG, 2010).

O quadro inflamatório gerado pela obesidade altera também o perfil de adipocinas, citocinas produzidas pelo tecido adiposo, como a leptina e fetuína A, alteração esta, que apresenta importante papel e correlação com patologias como a DRC. Adicionalmente, a inflamação adiposa atenua a produção do hormônio protetor adiponectina, que apresenta efeito anti-inflamatório, antiaterogênico e sensibilizador à insulina, reduzindo a resistência à insulina, a inflamação e o estresse oxidativo (DECLÈVES *et al.*, 2011; KACSO *et al.*, 2012; BÖRGESON; SHARMA, 2013).

A adiponectina, uma proteína de 30kDa presente no plasma, é secretada pelos adipócitos e as baixas concentrações parece ser o fator preditivo para morte por causas cardiovasculares em pacientes com disfunção renal (SHARMA *et al.*, 2008). Em estudo de KACSO *et al.* (2012), com pacientes com diabetes tipo 2, foi encontrado que os indivíduos que apresentavam hipoadiponectinemia tiveram severo dano renal comparados ao controle. Ainda, constatou-se que a concentração plasmática de adiponectina é um dos mais importantes fatores para o aumento da proteinúria.

A adiponectina apresenta papel protetor via proteína AMPK (enzima adenosina monofosfato cinase). A adiponectina ativa a AMPK o que promove proteção contra albuminúria via redução do estresse oxidativo. Estresse oxidativo este promovido principalmente pela obesidade, resistência à insulina e hipertensão. Em condições fisiológicas a adiponectina e a AMPK regulam algumas proteínas de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como a Nox4, um dos membros da família de oxidases NADPH (adenina nicotinamida fosfato de dinucleotídeo), considerada a principal fonte de produção de ânion superóxido em animais que consomem dieta

hiperlipídica. Em casos que há deficiência de adiponectina, a Nox4 acaba sendo estimulada e há maior produção de ERO, aumento da produção de ânion superóxido, com redução do óxido nítrico (NO), aumento da albuminúria e na incidência de injúria renal com dano nos podócitos (SHARMA *et al.*, 2008; DECLÈVES *et al.*, 2011; ELMARAKBY; IMIG, 2010). Fato este revertido quando há a administração de adiponectina para os indivíduos deficientes destas, como comentado em estudo de SHARMA e colaboradores (2008).

A adiponectina exhibe propriedades renoprotetoras até em reverter perda dos processos podais em indivíduos com disfunção renal através da indução da ativação da AMPK. Ainda, a adiponectina é capaz de atenuar o fator nuclear NF- κ B mediado pela disfunção endotelial, reduzir a adesão de monócitos ao endotélio e a proliferação celular (IX; SHARMA, 2010; DECLÈVES *et al.*, 2011; BÖRGESON; SHARMA, 2013).

Ainda não está completamente elucidado, mas sabe-se que o consumo de calorias em excesso reduz a ativação da AMPK e aumenta a adiposidade. A redução da AMPK induz o acúmulo de lipídeos no fígado que ativa a fetuína-A. O acúmulo de lipídeos no fígado pode gerar uma das manifestações da obesidade, a esteatose hepática não-alcóolica. A fetuína-A, uma glicoproteína hepática que apresenta papel na deposição ectópica de cálcio, em alta concentração tem relação com a resistência à insulina e estimula o aumento do tecido adiposo, e juntamente com este, reduz a concentração de adiponectina. A baixa concentração de adiponectina diminui a ativação da AMPK nos rins gerando albuminúria e redução da taxa de filtração glomerular (IX; SHARMA, 2010).

A AMPK é uma proteína serina/treonina cinase e tem como papel avaliar a energia disponível para célula. Após exposição celular de baixa glicose ou redução dos estoques de energia, há estímulo para produção e ativação da AMPK e, em condições de pós-refeição, a ativação da AMPK é reduzida e se tem o crescimento celular e do organismo normalmente. Em condições de excesso de calorias, sua ativação é completamente suprimida, o que no caso dos rins, por exemplo, leva à hipertrofia celular, acúmulo de moléculas de matriz e expansão mesangial, características da doença renal crônica relacionada à obesidade (KASINATH *et al.*, 2009; IX; SHARMA, 2010).

Modelos animais de obesidade reportam acúmulo lipídico dentro do parênquima renal, gerando lipotoxicidade, estresse oxidativo, inflamação e fibrose, características que levam ao dano renal e à hipertensão. Um destes modelos é a obesidade pelo consumo de dieta hiperlipídica (HFD), onde em camundongos foi causado acúmulo lipídico nos glomérulos e nos túbulos proximais, infiltração de macrófagos, albuminúria, aumento da pressão arterial sistólica e do estresse oxidativo, alteração do manejo de sódio, alargamento da área glomerular e de matriz mesangial comparados aos animais que receberam dieta hipolipídica. Além disso, foi verificado que a prevenção do aumento de peso é por si só capaz de retardar o desenvolvimento das alterações renais (DEJI *et al.*, 2009; FOSTER *et al.*, 2011).

Em estudo de DECLÈVES e colaboradores (2011), utilizando dieta hiperlipídica com camundongos C57BL/6J, verificou que os efeitos gerados por esta dieta são tempo-dependente. O consumo da dieta hiperlipídica por uma semana foi capaz de aumentar o peso corporal os animais, reduzir a concentração plasmática de adiponectina e elevar as concentrações plasmáticas de MCP-1 e urinárias de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), fatores que precedem a excreção urinária de albumina. Além disso, com este tempo de dieta hiperlipídica, a expressão de AMPK foi significativamente diminuída, o que foi revertido quando foi administrado um ativador da AMPK, o AICAR (*5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-D-furanosyl 5-monophosphate*), reduzindo a hipertrofia renal induzida pelo aumento de peso pelo consumo da dieta hiperlipídica.

A aterosclerose e a glomeruloesclerose apresentam relação e esta é sugerida há algum tempo, onde as células espumosas (*foam cells*), oriundas da fagocitose de lipídeos pelos macrófagos, seriam poderiam participar no desenvolvimento tanto da aterosclerose quanto da glomeruloesclerose. Na aterosclerose é comum que o aumento dos ácidos graxos livres (AGL) estimula a síntese de triacilgliceróis e de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL – *very low density lipoprotein*), o que aumenta as LDL aterogênicas e oxidadas no fígado e em outros tecidos. A VLDL, a lipoproteína de densidade intermediária (IDL – *intermediate density lipoprotein*) e a LDL - colesterol estimulam a síntese sistêmica e renal de IL-6, TNF- α e TGF- β e induzem a proliferação das células mesangiais. LDL oxidados estimulam a matriz extracelular e a síntese de

MCP-1 que elevam a infiltração de leucócitos. Ainda, o aumento dos ácidos graxos livres gera acúmulo destes na albumina circulante. Esta saturação de AGL na albumina tem sido reportada como uma das causas de inflamação tubulointersticial, aumento da infiltração de macrófagos, da apoptose celular e da proliferação de células corticais (THOMAS *et al.*, 2002; ZOCCALI, 2009).

A presença de lipídeos infiltrados no tecido renal também pode gerar aumento da pressão intersticial renal através da compressão de vasos existentes nos rins, como a veia renal e vasos linfáticos. Em modelos animais, a compressão de vasos nos rins leva ao aumento da pressão intersticial, volume renal e, na presença de expansão volumétrica, gera aumento da reabsorção de sódio na porção ascendente da alça de Henle e/ou em outros segmentos tubulares com redução na excreção renal de sódio (HALL *et al.*, 2004; DEJI *et al.*, 2009; FOSTER *et al.*, 2011).

Outro mecanismo onde a hiperlipidemia, presente na maioria dos indivíduos obesos, poderia contribuir para a progressão do dano renal seria pelo aumento da expressão renal de proteínas ligadoras aos elementos regulatórios de esteróis (SREBP-1 e SREBP-2 - *sterol regulatory element-binding proteins*) que geram acúmulo de colesterol e triacilgliceróis nos rins, estes aumentam o inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1 - *plasminogen activator inibidor-1*), o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF - *vascular endothelial growth factor*), colágeno tipo IV e fibronectina, resultando em glomeruloesclerose e proteinúria. Dados estes encontrados em camundongos C57BL/6J que consumiram dieta hiperlipídica por doze semanas. Além disso, os animais desenvolverem obesidade, hiperglicemia e hiperinsulinemia (JIANG *et al.*, 2005; PRAGA; MORALES, 2006).

Associadas a estas alterações lipídicas temos que a hiperinsulinemia e a hiperglicemia podem induzir danos renais por vários mecanismos, incluindo a ativação da proteína cinase C, estresse oxidativo, ativação do NF- κ B e outros mecanismos que se relacionam com inflamação, apoptose e necrose celular (ZOCCALI, 2009).

Além da presença de lipídeos ou infiltrados celulares serem capazes de induzir inflamação e progressão da doença renal, temos que as células residentes nos rins também podem ser cruciais tanto na iniciação quanto na progressão da injúria renal. Por exemplo, as células mesangiais glomerulares, que respondem a diversos

mediadores pró-inflamatórios podem atuar como agentes proliferativos, sintetizadores de matriz extracelular e, principalmente, produtores de várias citocinas propagando a resposta inflamatória. Os estímulos para sua produção de citocinas são muitos, mas os principais seriam: LPS, IL-1, TNF- α , TGF-1 β , onde após serem estimulados e liberados, rapidamente o MCP-1 é produzido e induz o influxo de macrófagos para o tecido. Entre as citocinas que mais são produzidas pelas células mesangiais, o MCP-1 é a principal, sendo o mediador predominante na inflamação e fibrose na DRC. (DIAZ ENCARNACION *et al.*, 2011).

Toxinas urêmicas também estão relacionadas com o desenvolvimento da aterosclerose e DRC. São consideradas um grupo heterogêneo de substâncias, principalmente compostos orgânicos, como peptídeos, que em condições normais, são excretados pelos rins saudáveis, mas são retidos no quadro de alteração da função renal. A contribuição das toxinas urêmicas para o desenvolvimento da DRC está principalmente relacionada ao estresse oxidativo e inflamação gerados pelos metabólitos urêmicos retidos no organismo. São capazes de ativar proteínas-chaves na via inflamatória como o NF- κ B, aumento de síntese de citocinas próinflamatórias, como TGF- β , e de proteínas de remodelamento celular, como a metaloprotease-1, contribuindo para a fibrose tubulointestinal (STINGHEN *et al.*, 2009; SHIMIZU *et al.*, 2011).

1.2.5 Relação entre Hipertensão e Obesidade na Doença Renal Crônica

A função alterada nos rins pode ser considerada uma importante causa e/ou uma consequência da hipertensão na obesidade. Um dos mecanismos centrais do aumento da pressão sanguínea poderia ser a união entre a elevação da reabsorção tubular de sódio juntamente com a sua maior retenção, com expansão do fluido extracelular, fato presente em alguns modelos de obesidade em animais e encontrado em quadros de pacientes obesos (HALL, 2003).

Como mostrado na FIGURA 2, o aumento da reabsorção tubular de sódio

também é acompanhado por uma taxa de filtração glomerular (TFG) compensatória inicial que auxilia na manutenção do balanço de sódio nos indivíduos obesos. Ainda não está completamente elucidado, mas sugere-se que o aumento da TFG seja mediada primeiramente pelo mecanismo de *feedback* da mácula densa, ativado pela reabsorção renal sódio, capaz de causar vasodilatação das arteríolas aferentes, secreção de renina, que ativa o sistema renina-angiotensina-aldosterona, levando a uma expansão de volume com ativação o sistema nervoso simpático. O único problema é que a hiperfiltração compensatória pode gerar ao longo do tempo perda funcional dos néfrons e produzir redução na filtração e na função renal com a instalação da doença renal crônica (HALL *et al.* 2004; PRAGA; MORALES, 2006; KURUKULASURIYA *et al.*, 2011; TESAURO *et al.*, 2012).

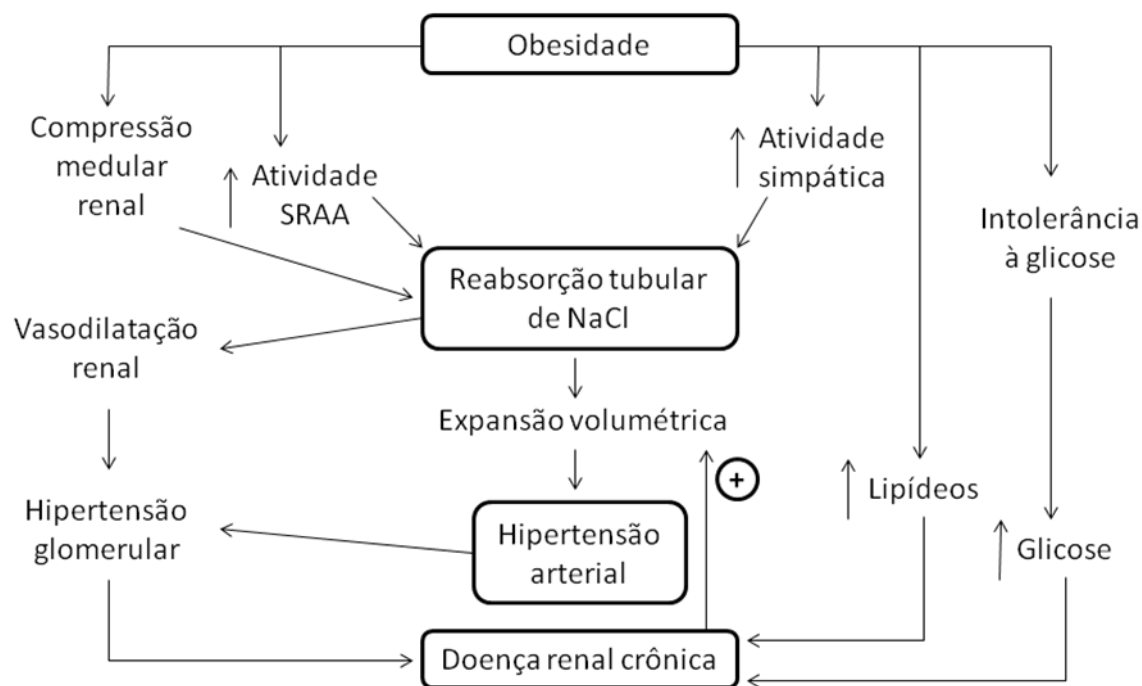


FIGURA 2 Resumo do mecanismo de indução da hipertensão e da injúria renal pela obesidade via ativação do sistema nervoso simpático, do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), pela compressão física nos rins e anormalidades metabólicas (modificado de HALL *et al.*, 2004).

O aumento do acúmulo visceral de gordura é outro fator importante no desenvolvimento da hipertensão e alterações renais. A causa seria a compressão renal

gerada pelo volume de tecido adiposo aumentando a pressão intrarrenal e contribuindo para maior retenção de sódio, exacerbando os efeitos para indução da hipertensão e injúrias renais (HALL *et al.*, 2004; KURUKULASURIYA *et al.*, 2011).

Outra causadora da retenção de sódio pelos túbulos renais e que está presente na maioria dos casos de obesidade é a resistência à insulina. A concentração plasmática de insulina na obesidade varia conforme o grau de intolerância à glicose, resistência à insulina e condições das células β pancreáticas. Em um quadro que há hiperinsulinemia compensatória pela resistência, há grande estímulo da insulina na reabsorção de sódio nos túbulos proximais mediada primeiramente pela ativação do substrato do receptor de insulina-2 (IRS-2) nas células deste segmento, além de levar à alteração do metabolismo de carboidratos (KOPPLE; FEROZE, 2011).

A doença renal crônica gerada pela obesidade ou por suas complicações, como diabetes tipo 2, resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão, pode ser induzida pela inflamação sistêmica, alteração do perfil de adipocinas e de proteínas protetoras da função renal, modificações na hemodinâmica renal e na reabsorção de sódio com ativação de sistemas hormonais e nervosos, todos certamente culminam na injúria do tecido renal com progressiva perda da função renal (SCHLONDORFF, 2008; EKNOYAN, 2011)

Pela DRC ser fator de risco para doença cardio- e cerebrovasculares e por estarem aumentando progressivamente as taxas de morbimortalidade de pacientes com DRC, substâncias, medicamentos ou não, que modulem os mecanismos de progressão da DRC são procurados a fim de modificar na forma de prevenção e/ou tratamento a progressiva perda da função renal em pacientes obesos com ou sem suas as complicações (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002; DEJI *et al.*, 2009).

1.3 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos caracterizados por apresentar longa cadeia de hidrocarbonetos com um grupo carboxila numa extremidade e um metila na

outra extremidade. Podem ser divididos em saturados ou insaturados, dependendo do grau de saturação da molécula. A ausência de duplas ligações é classificada como saturados e na presença de duplas ligações, insaturados. Os ácidos graxos mais comuns e os principais adquiridos pela dieta são na forma de triacilgliceróis (TAG), compostos de três cadeias de ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol. Incluem ainda di- e monoacilgliceróis, esfingolipídeos, classificados por ligações com outras moléculas, ácidos graxos livres, colesterol, fitoesteróis, de acordo com sua origem, pigmentos e vitaminas lipossolúveis. Podem ser armazenados para reserva energética, transformados em hormônios, transportadores, mensageiros celulares e constituintes da membrana celular (ALBERTS *et al.*, 2004; RUXTON *et al.*, 2004; FRITSCHÉ, 2006; SALA-VILA; MILES; CALDER, 2008; CALDER, 2012; LORENTE-CEBRIÁN *et al.*, 2013)

Existem três importantes famílias de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI): ômega 3 (n-3 ou ω -3), ômega 6 (n-6 ou ω -6) e ômega 9 (n-9 ou ω -9), sendo que esta nomenclatura se refere à posição da primeira dupla ligação a partir do terminal metila, carbono denominado ômega da cadeia de hidrocarboneto (SALA-VILA; MILES; CALDER, 2008; CALDER, 2012; LORENTE-CEBRIÁN *et al.*, 2013).

A biossíntese dos ácidos graxos n-3 e n-6 compartilham a mesma enzima desaturase (Δ 6-desaturase), e, portanto competem pela mesma via metabólica. A Δ 6-desaturase prioriza o ácido α -linolênico (ALA; 18:3 n-3), mas em altas concentrações de ácido linoléico (AL; 18:2 n-6) podem inibir a conversão do ALA em EPA e DHA, reduzindo a quantidade destes ácidos graxos (RUXTON *et al.*, 2004; NOORI *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2012; LEE; AN, 2013).

O ácido graxo α -linolênico é precursor do ácido eicosapentaenóico (EPA; 20:5 n-3), docosapentaenóico (DPA; 22:5 n-3) e do docosahexaenóico (DHA; 22:6 n-3) e o ácido linoléico é precursor do ácido araquidônico (AA; 20:4 n-6). Os ALA e AL possuem alguns efeitos opostos sobre vasodilatação, perfil lipídico, entre outros, e são considerados essenciais para a dieta humana, pois não podem ser sintetizados e interconvertidos pelo organismo humano (SALA-VILA; MILES; CALDER, 2008; WU *et al.*, 2012; LEE; AN, 2013; LORENTE-CEBRIÁN *et al.*, 2013; SIMOPOULOS, 2013).

O AL é encontrado em quantidades significantes em diversos óleos vegetais,

como o de milho e soja, e seus derivados, como margarinas. O ALA está presente em vegetais de folhas verdes escuras e em alguns óleos vegetais, como o de linhaça. Os dois juntos contribuem com 95 a 98% dos AGPI na dieta de países ocidentais. A ingesta de AL, nestes países, aumentou drasticamente desde a década de 1970 com a introdução de óleos e margarinas no preparo dos alimentos. Já o consumo de ALA não foi modificado expressivamente durante o tempo. Entretanto, a razão n-6:n-3, pelo aumento do consumo de n-6, apresentou grande elevação. A razão recomendada é de 4:1 sendo que em populações ocidentais podem ser observadas razões de 5, 20 e até 40:1 dependendo da região (SALA-VILA; MILES; CALDER, 2008; NOORI *et al.*, 2011; SIMOPOULOS, 2013).

O ácido araquidônico, derivado do ácido linoléico, é encontrado nas carnes e vísceras e a ingesta estimada é de 50 a 500mg/dia. Já os derivados do ácido linolênico, o EPA, DPA e DHA estão presentes nos peixes, especialmente nos peixes mais gordurosos, como tuna, salmão, sardinha e carapau, e também, nos vegetais de folhas verde-escuras. A porção de um destes peixes pode prover entre 1,5 a 3,5g destes AGPI n-3. O óleo de peixe (OP) disponível comercialmente apresenta esse AG numa proporção de cerca 30% do total de lipídios, de forma que uma cápsula contendo 1g de OP normalmente provém aproximadamente 300mg dos AGPI n-3 (SALA-VILA; MILES; CALDER, 2008; LORENTE-CEBRIÁN *et al.*, 2013).

Os AGPI são importantes constituintes das células, onde assumem papéis de assegurar funções adequadas de proteínas de membrana, por manterem a fluidez da membrana plasmática e regularem a sinalização celular, por ativação de fatores de transcrição, expressão gênica e função celular. As deficiências de n-3 no organismo contribuem para resistência à insulina e síndrome metabólica, anormalidades metabólicas do cérebro e esteatose hepática não-alcoólica. A resistência à insulina gera um quadro compensatório de hiperinsulinemia e os dois propiciam no desenvolvimento da hipertensão, principalmente pela retenção de sódio pelos túbulos renais e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona; no desenvolvimento do diabetes tipo 2, pela inabilidade da insulina de reduzir a glicemia; e na redução da oxidação dos ácidos graxos com ativação da lipogênese facilitando a progressão da obesidade (SALA-VILA; MILES; CALDER, 2008; LORENTE-CEBRIÁN *et al.*, 2013; SIMOPOULOS, 2013).

Uma dieta rica em OP contendo alto teor de ácidos graxos n-3, como EPA e DHA, apresenta significantes propriedades anti-inflamatórias, antitrombóticas, antiarrítmicas e vasodilatadoras através da inibição de eicosanóides pró-inflamatórios derivados dos ácidos graxos n-6, como o AA e da diminuição de citocinas pró-inflamatórias. Na membrana plasmática, os ácidos graxos n-3 competem com os ácidos graxos n-6 para a incorporação nestas membranas celulares, sendo que as enzimas ciclooxigenase (COX) e da 5-lipoxigenase (5-LOX) utilizam os ácidos graxos incorporados na membrana como substratos para suas reações. Quando há maior incorporação de AGPI n-6 há produção de eicosanóides com ação pró-inflamatória, vasoconstritora, efetora da febre, eritema, trombos, migração e da proliferação celular, como a prostaglandina (PG) E₂, leucotrienos (LT) B₄ e tromboxano (TX) A₂ são significativamente diminuídos, com consequente produção das classes 3 de PG e TX e da classe 5 dos LT, pelos ácidos graxos n-3 (LOMBARDO; CHICCO, 2006; BHATTACHARYA *et al.*, 2007; CALDER, 2007; NOORI *et al.*, 2011; CALDER, 2012; SIMOPOULOS, 2013).

1.3.1 AGPI na função renal

Nos rins o sistema enzimático da ciclooxigenase é a via mais importante de metabolização do AA. O principal papel fisiológico dos produtos derivados do metabolismo do AA no rim é a modulação da ação de outros autacóides e hormônios, particularmente em relação à ação destas substâncias no tônus vascular, na função glomerular e no manejo tubular de água e eletrólitos. Os produtos derivados da ação da ciclooxigenase sobre o AA estão relacionados com mudanças observadas na função renal em várias patologias tais como dano glomerular, várias formas de insuficiência renal aguda e/ou crônica, nefrotoxicidade por ciclosporina, síndrome hepatorenal, nefropatia diabética, nefropatia por IgA e hipertensão essencial (HARRIS; BREYER, 2007; HAO; BREYER, 2008).

Entretanto, a utilização de dietas ricas em AGPIs n-3 determina uma competição

destes substratos com as vias metabólicas do AA, resultando na formação de produtos finais biologicamente inativos ou pouco potentes. Consequentemente, a suplementação com AGPI tem sido utilizada para alterar a evolução das patologias renais nas quais os derivados do AA estão envolvidos. Na maioria destas patologias a evolução da doença foi significativamente reduzida pela utilização de um suplemento dietético rico em óleo de peixe (DONADIO, 2001; HAO; BREYER, 2008; LEE; AN, 2013).

O aumento da produção de ERO é associado com os eicosanóides derivados do ácido araquidônico. Estes têm importante papel na regulação na hemodinâmica renal e filtração glomerular, como a PGE_2 sintetizada pelas estruturas vasculares e renais, aumentando o fluxo renal e a taxa de filtração glomerular, além de promover a inflamação, como já citado (DOLEGOWSKA *et al.*, 2006).

PGE_2 e TXA_2 são os prostanóides mais produzidos pelo tecido renal e apresentam como via de ação clássica receptores ligados à proteína G (EP1 a EP4 e TP, respectivamente), onde são expressos nos podócitos e mesângio. O receptor EP1 pode modular aspectos na progressão da doença renal diabética, como hipertrofia glomerular, expansão da matriz, produção de TGF- β e proteinúria. Outro fator importante na doença renal diabética é a atividade da COX-2, que aumenta a síntese de PGE_2 e TXA_2 com agravamento das lesões glomerulares e também da proteinúria nos indivíduos. Um possível ativador da COX-2 é o TNF- α , que induz a atividade do NF- κ B, este se transloca ao núcleo sinalizando aumento da expressão da COX-2. Neste caso, há uma relação íntima entre proteínas que no rim apresentam funções hemodinâmicas, como a COX-2 e seus metabólitos, com citocinas e fatores nucleares envolvidos diretamente na inflamação, sendo um dos possíveis mecanismos entre a disfunção vascular e a inflamação renal induzidas pela obesidade (MAKINO *et al.*, 2002; STITT-CAVANAGH; MACLEOD; KENNEDY, 2009; ELMARAKBY; IMIG, 2010; NOORI *et al.*, 2011).

Outras classes da lipoxigenase estão envolvidas na produção de metabólitos envolvidos com células do sistema imunitário e em alguns tecidos provocando inflamação e dano celular. Os 12- e 15-LOX catalisam a síntese de 12- e 15-ácido hidroieicosatetraenóico (HETEs), respectivamente, nos glomérulos, células mesangiais, túbulos corticais e vasos renais, onde afetam a hemodinâmica renal e a

taxa de filtração glomerular. Os 12- e 15-HETE são relacionados com a resposta inflamatória e, especificamente, o 12-HETE inibe a redução do fluxo sanguíneo renal estimulado pela angiotensina II (DOLEGOWSKA *et al.*, 2006).

Recentemente foi descoberto que o EPA e o DHA são precursores importantes das pró-resolvinas, autacóides, resolvinas (designadas E e D, a partir do EPA ou DHA), protectinas e maresinas, agentes bioativos envolvidos na resolução da inflamação e atividades anti-inflamatórias e de regulação do sistema imunitário, inibindo a produção de citocinas inflamatórias e diminuindo o recrutamento e diapedese de leucócitos (WU *et al.*, 2012; HONG; LU, 2013; LORENTE-CEBRIÁN *et al.*, 2013).

1.3.2 Papel dos AGPI na inflamação, resistência à insulina e obesidade

Durante o desenvolvimento da doença renal crônica, como já discutido anteriormente, temos que injúria inicial precede a inflamação que ocorre no tecido. A inflamação ativa leucócitos, como os neutrófilos, macrófagos e células dendríticas do endotélio vascular e epitélio tubular. Os leucócitos ativados produzem ERO e fatores inflamatórios, como citocinas, como: TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6, prostaglandinas, leucotrienos, que tornam a inflamação amplificada e de forma continuada para o dano tecidual. Enquanto ocorre a propagação da inflamação, produtos do próprio organismo vão contra esta corrente, tentando resolver e terminar com o quadro inflamatório. Alguns tipos de leucócitos produzem mediadores lipídeos pró-resolução, estas substâncias são: lipoxina A4 (LX), protectina/neuroprotectina D1 e resolvina D1, derivadas dos AGPI EPA e DHA, que tem papel de suprimir a inflamação seguida de fibrose no tecido renal (HONG; LU, 2013).

Em estudo com humanos, onde estes receberam por 4 semanas 7g/dia de n-3, n-6 ou n-9 e foram analisados o RNA mensageiro (mRNA) de marcadores inflamatórios da aterosclerose em células mononucleares, somente o consumo de n-3 foi capaz de alterar os perfis analisados, reduzindo o mRNA de fatores relevantes para aterosclerose, como o MCP-1, com possível redução do recrutamento dos leucócitos

nestes indivíduos (BAUMANN *et al.*, 1999; LORENTE-CEBRIÁN *et al.*, 2013).

Dietas ricas de AGPI n-3 apresentam propriedades anti-inflamatórias e podem apresentar proteção contra aterosclerose e suas consequências, como o infarto do miocárdio e morte súbita. De uma forma geral, seus efeitos benéficos geram redução da concentração dos triacilgliceróis e aumento do HDL, redução do estresse oxidativo, melhora na pressão arterial, na excitabilidade cardíaca, na função plaquetária, endotelial e vascular e no sistema imunitário (NOORI *et al.*, 2011; LEE; AN, 2013).

Considerando que o diabetes e a resistência à insulina são umas das principais causas de doença crônica renal e estão presentes em pacientes com obesidade crônica, a atenuação do quadro diabético ou do aumento da sensibilização à insulina pode trazer benefício na atenuação disfunção renal. Trabalhos epidemiológicos em humanos indicam que os ácidos graxos poliinsaturados n-3 podem reduzir em, alguns casos, o desenvolvimento da resistência à insulina e diabetes (WU *et al.*, 2012). Da mesma forma, resultados em modelos animais (ratos e camundongos) sugerem que o óleo de peixe ou ácidos graxos poliinsaturados n-3 individuais (ALA, EPA, ou DHA) podem prevenir a resistência à insulina, e em alguns estudos incrementaram a secreção de insulina (LOMBARDO; HEIN; CHICCO, 2007; WU *et al.*, 2012).

Têm sido propostos vários mecanismos para explicar o papel do n-3 na redução da resistência à insulina. Por exemplo, os AGPIs n-3 incrementam a expressão e secreção de adiponectina, fator já citado como sensibilizador para insulina. Outro mecanismo de ação é a redução na produção de eicosanóides inflamatórios, visto que o incremento na inflamação é um dos fatores mais importantes no desenvolvimento da resistência à insulina. Por último, o papel do n-3 sobre a prevenção do diabetes pode ser devido ao n-3 regular a expressão de inúmeros genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e lipídeos pela modulação da atividade ou expressão de fatores de transcrição, como receptores ativados de proliferador de peroxissomo γ (PPAR γ), que aumentam a oxidação de glicose e inibem a síntese de lipídeos, SREBP-1C, fatores nucleares hepáticos e receptores X retinóicos e hepáticos (JUMP *et al.*, 2005; YAMAMOTO *et al.*, 2005; SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008; FEDOR; KELLEY, 2009; WU *et al.*, 2012).

Pesquisas utilizando a suplementação com óleo de peixe, rico em AGPI n-3, tem

sido utilizado não somente por modificar a sensibilidade à insulina e intolerância à glicose, mas também em pacientes com complicações derivadas do diabetes como cardiovasculares e renais. WONG *et al.* (2010) descreve que a suplementação de pacientes com diabetes tipo 2 por 12 semanas com 4g de óleo de peixe/dia proveu melhora da função renal, mesmo sem mudanças na função endotelial, perfil metabólico, pressão arterial e estresse oxidativo.

Estudo de NOORI e colaboradores (2011) avaliou a associação entre a ingestão de n-3 e a razão n-6/n-3 com mudanças na concentração de um marcador de inflamação sistêmica, a proteína C reativa, e a manutenção de pacientes com doença renal crônica avançada na hemodiálise. Foi encontrado, então, que uma maior razão n-6/n-3 relacionou-se com aumento da proteína C reativa no plasma e maior índice da mortalidade destes pacientes.

As concentrações de ácidos graxos n-3 circulantes no plasma é inversamente proporcional com as concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias. O trabalho de FERRUCCI *et al.* (2006) demonstra que as concentrações de AGPI e, especialmente, os da família n-3, que refletem a ingestão habitual, estão associados com menor concentração de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1ra, TNF- α e proteína C reativa, e aumentou a concentração das citocinas consideradas anti-inflamatórias, como a IL-10, IL-6ra e TGF- β , trazendo benefícios para pacientes afetados com doenças caracterizadas pela inflamação crônica.

1.3.3 Potencial papel dos AGPI no desenvolvimento da Doença Renal Crônica

Pacientes com doença renal em estágio final apresentam altos índices de morbimortalidade em virtude de doenças cardiovasculares, principalmente aterosclerose. Um dos marcadores independentes destes eventos cardiovasculares é a concentração plasmática elevada de homocisteína. Estudos animais demonstram que a homocisteína causa disfunção endotelial e proliferação das células musculares da íntima, quadro que promove a aterosclerose. A relação entre o consumo de

suplemento dietético na dose de 1,7g de n-3 por dia durante 3 meses em pacientes com doença renal de estágio final não foi capaz de reduzir as concentrações plasmáticas de homocisteína, mas a dosagem da concentração plasmática de DHA foi inversamente proporcional à concentração plasmática de homocisteína, podendo ser considerada uma profilaxia para pacientes com doença renal avançada (RASMUSSEN *et al.*, 2010).

Considerando que as células mesangiais apresentam papel importante no início e progressão da doença renal crônica pela produção de citocinas, principalmente MCP-1 que recruta macrófagos para o tecido e progride com a inflamação, o óleo de peixe está sendo usado para tratar quadros de glomerulonefrite proliferativa mesangial e esclerótica associada com a nefropatia por IgA. Sua ação antiproliferativa pode ser devida à inibição da ativação da ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) e suprimindo a produção da resposta inflamatória na injúria tecidual (DIAZ ENCARNACION *et al.*, 2011).

Em trabalho de DIAZ ENCARNACION *et al.* (2008), utilizando animais hipertensos por sensibilidade ao sal, verificou que o óleo de peixe presente na ração consumida por 28 dias reduziu a pressão arterial, a excreção urinária de proteínas, as concentrações plasmáticas de colesterol e de triacilgliceróis, as manifestações histopatológicas da injúria renal, incluindo hipertrofia vascular, esclerose segmental e global glomerular, fibrose intersticial e atrofia tubular. A inflamação intersticial foi menor e as células positivas para ED-1 (marcador para macrófagos/monócitos) foi reduzida no tecido renal pelo OP, juntamente com menor expressão do antígeno nuclear de proliferação nuclear (PCNA – *proliferation cell nuclear antigen*). Todos estes benefícios do óleo de peixe na redução da atividade proliferativa e inflamatória encontrados são devidos: pela redução da expressão da pERK (*phosphoERK*) e da ativação do NF- κ B, diminuição da expressão da COX-2 e da translocação para membrana da subunidade p47^{phox} e p67^{phox} da NADPH oxidase.

O mecanismo preciso da ação dos AGPI n-3 na supressão a atividade da ERK e do NF- κ B não está completamente estabelecido. Mas como já citado anteriormente, os n-3 apresentam como substratos as resolvinas e protectinas que são compostos anti-inflamatórios potentes podendo atuar sobre proteínas de sinalização intracelular (DIAZ

ENCARNACION *et al.*, 2011; LEE; AN, 2013).

Os AGPI n-3 sendo uma família biologicamente ativa de ácidos graxos, apresentam uma gama de funções já descritas em diversos tecidos, órgãos, sistemas e em tratar e/ou prevenir doenças. Seus papéis em funções fisiológicas incluem desde mecanismos de sinalização na membrana celular, no citosol, ou diretamente no núcleo, ativando ou inibindo expressão protéica e gênica chaves na regulação da inflamação, na lipogênese, no metabolismo de carboidratos, na funcionalidade de tecidos, como o tecido renal, e competindo com os AGPI n-6 vias enzimas produtores de substâncias biologicamente ativas que apresentam estas e outras funções (CALDER, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

O excesso de peso e a obesidade, considerados juntos uma pandemia, afetam principalmente adultos, mas apresentam crescimento exponencial em crianças. O aumento da prevalência da obesidade é primeiramente motivado pela ingestão alimentar aumentada em quantidade e em energia juntamente com redução de atividade física regular (ABESO, 2010; KOPPLE; FEROZE, 2011).

A obesidade gera um quadro inflamatório sistêmico de baixo grau, que culmina no desenvolvimento de enfermidades como resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia, aterosclerose, hipertensão, microalbuminúria e doença renal crônica (HALL *et al.*, 2004; DECLÈVES *et al.*, 2011; BÖRGESON; SHARMA, 2013).

A doença renal crônica é caracterizada por perda progressiva da função renal e pode ser gerada diretamente pela obesidade ou, ainda, por suas complicações, como diabetes tipo 2, resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão. O quadro metabólico gerado na obesidade apresenta alteração do perfil de adipocinas e de proteínas protetoras da função renal, com modificações na hemodinâmica renal e ativação de sistemas hormonais e nervosos, culminando com injúria do tecido renal e progressiva perda da função renal (SCHLONDORFF, 2008; EKNOYAN, 2011).

O óleo de peixe, rico em ácidos graxos n-3, apresenta diversas funções já descritas que inclui desde mecanismos de sinalização celular, modulação da expressão protéica e gênica de regulação da inflamação, da lipogênese e da funcionalidade de tecidos, como o tecido renal (CALDER, 2012).

Visto que a obesidade pode gerar alterações na função e no tecido renal e que o óleo de peixe apresenta grande potencial como modulador inflamatório, mesmo que seus efeitos em pacientes obesos e em modelos animais sejam ainda contraditórios, justifica-se a utilização, em modelo animal, da suplementação com óleo de peixe visando atenuar as alterações renais geradas pela obesidade.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste projeto foi investigar as alterações metabólicas e na função e estruturas renais de camundongos *Swiss* geradas pelo consumo de dieta rica em carboidratos ou rica em lipídeos e o papel do óleo de peixe (rico em AGPI n-3) sobre estas modificações.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a indução do modelo experimental;
- Avaliar glicemia em jejum, teste de tolerância à glicose e perfil lipídico sérico;
- Avaliar ganho de peso e consumo de ração dos animais;
- Verificar peso do rim e tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal;
- Avaliar a função glomerular pelo *clearance* de creatinina;
- Avaliar a excreção urinária de proteínas totais;
- Avaliar as concentrações plasmáticas de creatinina, proteínas totais e uréia;
- Verificar os aspectos gerais da função tubular renal por:
 - dosagens plasmáticas e urinárias de eletrólitos (Na^+ e K^+) e *clearance* de Lítio;
- Avaliar a excreção urinária de prostaglandina E_2 e tromboxano B_2 ;
- Avaliar a concentração de TNF- α no tecido renal e no plasma;
- Avaliar a concentração plasmática de adiponectina e de insulina;
- Avaliar a excreção urinária de albumina;
- Avaliar expressão de desmina, vimentina, α -SMA, PCNA e pJNK no tecido renal;
- Avaliar expressão de proteínas (COX-2, AMPK e NF- κ B p65) do tecido renal;
- Avaliar o perfil de ácidos graxos do tecido renal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR) nº 476B (ANEXO).

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss com aproximadamente 6 semanas de vida (30-40g), obtidos do biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 horas), em ambiente com temperatura controlada de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ com ração de acordo com o protocolo experimental e água à vontade.

Inicialmente os animais foram distribuídos em três grupos (FIGURA 3), grupo S (*standard*) que recebeu ração padrão NUVILAB CR1[®] (Sorgob, São Paulo, SP, Brasil), grupo ração rica em carboidrato (HC – *high carbohydrate*) e o grupo que recebeu ração rica em lipídeos (HF – *high fat*). As rações HC e HF foram preparadas com a utilização do protocolo desenvolvido por ARAÚJO *et al.* (2007), onde a ração rica em carboidrato e em lipídeos são preparadas a partir dos compostos descritos no referido trabalho (TABELA 1).

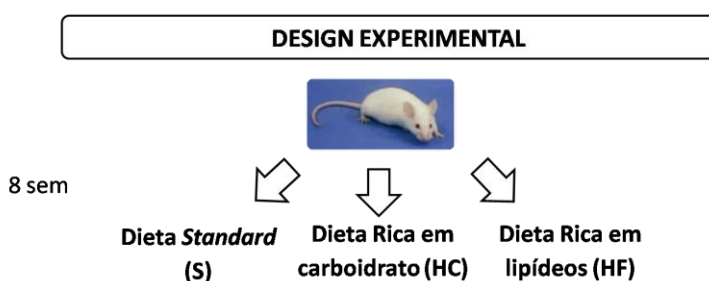


FIGURA 3 Design experimental da formação dos três grupos com dietas modificadas no período de indução do modelo experimental. Os grupos permaneceram consumindo as respectivas rações descritas por oito semanas.

TABELA 1 Composição das dietas rica em carboidrato (HC) e em lipídeos (HF), em g/kg.

Ingredientes (g/kg)	Ração HC	Ração HF
Amido de milho	465.7	115.5
Caseína	140	200
Amido dextrinizado	155	132
Sacarose	100	100
Óleo de soja	4	35
Banha de suínos	36	315
Celulose microfina	50	50
Mix de minerais	35	35
Mix de vitaminas	10	10
L-cistina	1.8	3
Bitartarato de colina	2.5	2.5

A ração *standard* apresenta como composição de acordo com o fabricante: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral aminoácido. Contendo a cada kg de ração: 12,5% umidade, 22% de proteína bruta, 4% de extrato etéreo, 8% de matéria fibrosa, 10% de matéria mineral, 1,4% de cálcio, 0,8% de fósforo, com enriquecimento de vitaminas e minerais. A composição de macronutrientes de todas as dietas utilizadas está descrita na TABELA 2. Os animais dos grupos S, HC e HF receberam as respectivas dietas por 8 semanas.

TABELA 2 Conteúdo calórico das dietas *standard*, rica em carboidrato e rica em lipídeos (kcal%).

Ingredientes	Ração <i>Standard</i> (%kcal)	Ração HC (%kcal)	Ração HF (%kcal)
Carboidratos	63.4	75.8	26.0
Proteínas	25.6	14.7	15.0
Lipídeos	11.0	9.5	59.0

4.2 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

4.2.1 Teste de tolerância intraperitoneal à glicose

Após as 8 semanas do consumo das rações padrão, rica em carboidrato ou em lipídeos, os animais permaneceram 12h em jejum para a realização do teste de tolerância intraperitoneal à glicose mediante a injeção intraperitoneal (ip) de uma solução de glicose (2g/kg de peso corporal). A glicemia foi determinada nos tempos zero (antes da ip), 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção, utilizando glicosímetro One Touch Ultra[®]. A área sob a curva (AUC – *area under curve*) foi avaliada a partir da formação de uma reta entre o tempo 0 e 120min do teste de tolerância à glicose e é expressa em mg de glicose/dL x min (ARAÚJO *et al.*, 2007).

4.3 SUPLEMENTAÇÕES COM ÓLEO DE PEIXE E ÓLEO DE GIRASSOL

Após o consumo das rações por 8 semanas, os grupos S, HC e HF foram distribuídos em 3 subgrupos para receber suplementações por 4 semanas conjuntamente com o consumo das suas respectivas rações, até a 12ª semana, via oral todos os dias (técnica de gavagem) com 1g/kg de peso corporal (p.c.). O primeiro grupo recebeu uma suplementação de óleo de peixe (AGPI n-3), sendo que o OP é obtido de uma preparação de lipídeos marinhos, rico em ácidos graxos n-3, gentilmente doado pela Fundação Herbarium (Curitiba, PR, Brasil), o qual contém em 1g/cápsula a proporção de 0,192g de EPA e 0,124g DHA. Um segundo grupo recebeu uma suplementação de óleo de girassol, na mesma dose, rico em ácidos graxos n-6, utilizando uma marca comercial; e um terceiro grupo recebeu somente a dieta habitual sem suplementação. A partir das suplementações e da indução do modelo obtivemos 9 grupos experimentais sendo eles grupo com ração padrão (S), padrão suplementado

com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG), ração rica em carboidrato (HC), suplementado com óleo de peixe (HCOP) ou com óleo de girassol (HCOG), e grupos que recebem dieta hiperlipídica (HF) e suplementados com OP (HFOP) e com óleo de girassol (HFOG), conforme representado pela FIGURA 4.

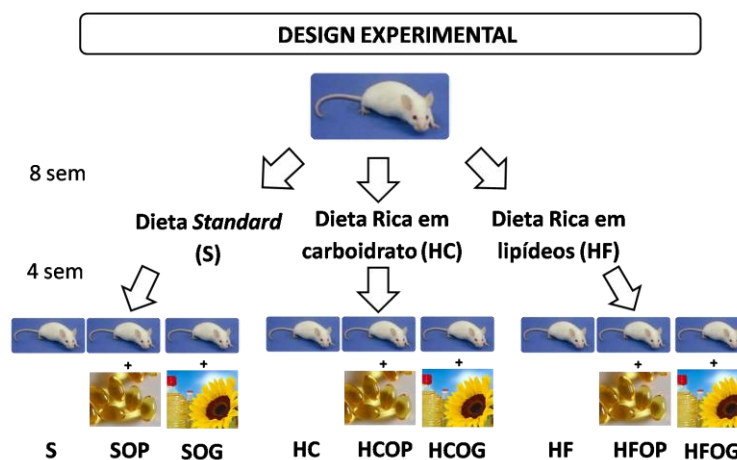


FIGURA 4 Design experimental da formação dos nove grupos com dietas modificadas e com associação com as suplementações de óleo de peixe ou óleo de girassol por quatro semanas. Permanecendo os seguintes grupos: com ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG), e com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com as mesmas suplementações (HCOP, HCOG e HFOP, HFOG).

Os animais foram pesados semanalmente para determinar o ganho de peso durante as 12 semanas do período experimental. Após o período de suplementação foi realizado o teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTIG), citado abaixo. Um dia após o TTIG os animais foram anestesiados e decapitados para a coleta de sangue, com o isolamento do plasma para as determinações bioquímicas, e coleta de tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal, fígado e rim. Os tecidos adiposos e o rim foram pesados, e o rim e fígado foram armazenados em freezer -80°C para posteriores análises. Além disso, todas as metodologias comentadas a partir deste ponto foram utilizadas nos animais que receberam as suplementações durante as quatro semanas.

4.3.1 Teste de tolerância intraperitoneal à glicose após 4 semanas de suplementação

Terminado o período de suplementação, os animais permaneceram 12h em jejum para a realização do teste de tolerância intraperitoneal à glicose mediante a injeção intraperitoneal (ip) de uma solução de glicose (2g/kg de peso corporal). A glicemia foi determinada nos tempos zero (antes da ip), 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção, utilizando glicosímetro One Touch Ultra[®]. A AUC foi avaliada a partir da formação de uma reta entre o tempo 0 e 120min do teste de tolerância à glicose e é expressa em mg de glicose/dL/min (ARAÚJO *et al.*, 2007).

4.4 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

Após as doze semanas de consumo de ração, os animais foram colocados durante 12h em gaiolas metabólicas para permitir a monitorização da diurese e coletas de amostras de urina e, posteriormente, de sangue para análise. Isto nos permitiu determinar algumas variáveis fundamentais na avaliação da função renal, tais como: filtração glomerular (*clearance* de creatinina); mecanismo de concentração-diluição urinária; manejo renal de íons (Na^+ , K^+ , e Lítio), entre outras análises.

4.4.1 Determinação da filtração glomerular (*Clearance* de creatinina)

Para a dosagem de creatinina plasmática e urinária foi utilizado o método de Jaffe modificado, com kit comercial (Labtest Diagnóstica[®]). Este método se baseia no princípio de que a creatinina do plasma reagem com a solução de picrato em meio alcalino formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente (HENRY; CANNON; WINKEKMAN, 1974). Resultado expresso em mg/dL.

Os valores de creatinina urinária e plasmática foram utilizados para calcular o *Clearance* de Creatinina (C_{cr}) o qual fornece um valor equivalente a taxa de filtração glomerular (TFG). A fórmula que foi utilizada foi:

$$C_{cr} = (U_{cr} \times V_u / P_{cr}) / M_a$$

Onde:

U_{cr} = concentração urinária creatinina (mg/dL);

V_u = volume urinário (mL/min);

P_{cr} = concentração plasmática de creatinina (mg/dL);

M_a = peso do animal (kg).

4.4.2 Dosagem de eletrólitos, osmolalidade, uréia e proteína totais

As determinações da concentração plasmática e urinária de Na^+ e K^+ foram realizadas por fotometria de chama Micronal B462 (Micronal S.A., São Paulo, Brasil). Com as concentrações plasmáticas e urinárias de sódio e potássio foram determinadas a Carga Excretada ($\mu\text{Eq}/\text{min}$) de Na^+ e K^+ e a Fração de Excreção (FE) (%) de Na^+ e estes parâmetros servem para avaliar o manuseio renal de íons, o cálculo utiliza as seguintes formulas:

$$\text{Carga excretada}_{ion} = U_{ion} \times V_u \quad (\mu\text{Eq}/\text{min})$$

$$FE_{Na^+} = [(U_{Na^+} \times V_u / P_{Na^+}) / C_{cr}] \times 100 \quad (\%)$$

Onde:

U_{ion} = concentração urinária de Na^+ , K^+ (mEq/L);

C_{cr} = clearance de creatinina (mL/min);

P_{ion} = concentração plasmática de Na^+ , K^+ (mEq/L);

V_u = volume urinário (mL/min).

A osmolalidade plasmática e urinária foi determinada pelo micro-osmômetro de pressão (Vapro5520® – Vapor Pressure Osmometer, WESCOR-USA). Esses valores foram utilizados para determinar o *Clearance* de água livre (C_{H_2O}), de acordo as seguintes fórmulas:

$$C_{\text{osm}} = (U_{\text{osm}} \times V_u / P_{\text{osm}}) / M_a$$

$$C_{\text{H}_2\text{O}} = V_u - C_{\text{osm}}$$

Onde:

U_{osm} = osmolalidade da urina (mOsm/kg);

V_u = volume urinário (mL/min);

P_{osm} = osmolalidade plasmática (mOsm/kg);

M_a = peso do animal (kg).

A determinação da concentração de proteínas totais no plasma e urina foi realizada pela técnica de Biureto (HENRY; CANNON; WINKEKMAN, 1974), com kit comercial de Katal[®] para plasma e pela técnica do complexo Vermelho de Pirogalol-Molibdato, com o kit Proti U/LCR[®] para as dosagens urinárias, com leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific[®]) a 545nm e 600nm (respectivamente), dados expressos em g/dL.

A concentração de uréia plasmática foi dosada utilizando um método colorimétrico enzimático, kit comercial Uréia CE[®] (Labtest Diagnóstica), instruções conforme fabricante, onde a uréia é hidrolisada pela urease a íons amônio. Estes na presença de pH alcalino com salicinato e hipoclorito de sódio, sob ação catalisadora do nitroprussiato de sódio forma azul de indofenol, lido a absorbância de 600nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific[®]), sendo a intensidade da cor formada, proporcional a quantidade de uréia da amostra (BERGMEYER, 1985), dados expressos em mg/dL.

4.4.3 Clearance de lítio

A fim de estudar o manejo tubular do Na^+ foi realizado o cálculo do *clearance* de lítio (CLi). Esta medida pode ser utilizada como marcador da reabsorção de Na^+ pelo túbulo proximal em animais submetidos a uma dieta com valores normais de ingestão

de sódio e potássio (BAK; THOMSEN, 2004; BOER *et al.*, 2005). O protocolo foi desenvolvido com a administração por gavagem de 60mM LiCl/100g p.c., 12 horas antes do início dos experimentos. Os animais permaneceram em gaiolas individuais, em jejum alimentar e com livre acesso a água. No final do período foi obtida uma amostra de sangue.

O *Clearance* de Lítio foi determinado utilizando a seguinte fórmula:

$$C_{Li} = (U_{Li} \times V_u / P_{Li})$$

Onde:

U_{Li} = concentração urinária de lítio (mEq/L);

V_u = volume urinário (mL/min);

P_{Li} = concentração plasmática lítio (mEq/L);

A partir dos valores de *Clearance* de Lítio e *clearance* de Na^+ foi possível também calcular outro parâmetro, a Excreção Pós-Proximal Fracional de Na^+ ($EPPF_{Na^+}$), que permitiu estimar o manuseio de sódio pelo túbulo distal (THOMSEN; NIELSEN; FLYVBJERG, 2002).

O parâmetro acima descrito foi determinado pela fórmula abaixo:

$$EPPF_{Na^+} = (C_{Na^+} / C_{Li^+}) \times 100 (\%)$$

Onde:

C_{Li} = *clearance* de lítio (mL/min);

C_{Na} = *clearance* de Na^+ (mL/min);

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE PLASMÁTICA

A concentração de glicose plasmática foi mensurada pelo método enzimático colorimétrico, utilizando o sistema comercial Liquiform[®] (Labtest Diagnóstica), de acordo com as instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 490nm da marca Biotek[®] (Biotek Instruments). Os resultados são expressos em mg/dL para glicemia.

4.6 DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO SÉRICO

O perfil lipídico plasmático foi determinado pelos métodos enzimáticos colorimétricos, conforme os sistemas comerciais Liquiform® (Labtest Diagnóstica). As amostras foram preparadas e a leitura da absorbância em espectrofotômetro realizadas de acordo com as instruções do fabricante. O LDL - colesterol foi calculado a partir das determinações do perfil lipídico acima citado. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 490nm da marca Biotek® (Biotek Instruments). As concentrações do colesterol, HDL e LDL - colesterol e triacilgliceróis plasmáticos são expressos em mg/dL.

4.7 EXCREÇÃO URINÁRIA DE PROSTAGLANDINA E₂, TROMBOXANO B₂ E ALBUMINA

A determinação da concentração da prostaglandina E₂ e tromboxano B₂ na urina foi realizada por kit para ELISA, seguindo-se as instruções do fabricante, Cayman Chemical – USA. A concentração de albumina na urina foi determinada também por kit para ELISA (Mouse Microalbumin ELISA), seguindo as instruções do fabricante Kamiya Biomedical Company – USA.

4.8 DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ADIPONECTINA, DE FATOR DE NECROSE TUMORAL- α (TNF- α) E DE INSULINA

Para determinação da concentração plasmática de adiponectina, de TNF- α e de insulina, o plasma foi submetido a ensaio imunoenzimático (ELISA) e foram seguidas as instruções do fabricante INVITROGEN® (Califórnia, USA) para adiponectina e TNF- α e

para insulina, instruções de MILLIPORE® (Billerica, MA, USA) e ALPCO IMMUNOASSAYS® (Salem, NH, USA). As concentrações de TNF- α foram expressas em pg/mL, a de adiponectina em μ g/mL e a de insulina em ng/mL.

4.9 DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO RENAL DE TNF- α

Para a determinação do conteúdo de TNF- α no tecido renal, este tecido (200mg) foi homogeneizado (BOSCH® GGS27 25000 rpm/min) em tampão de lise (1:1) (Tris base 100mM, EDTA 10mM, SDS 1%, Fluoreto de Sódio 100mM, Pirofosfato de Sódio 10mM, Ortovanadato de Sódio 10mM), centrifugado por 7 min a 13226g (Hettich MIKRO 220R) e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da concentração da TNF- α por kit para ELISA, seguindo-se as instruções do fabricante R&D Systems® (Minneapolis, MN, USA). Para normalizar esta concentração o sobrenadante coletado foi também utilizado para a quantificação protéica utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976), melhor descrito posteriormente.

4.10 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (*HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY* – HPLC)

Para determinação do perfil de ácidos graxos do tecido renal, cada amostra passou por três etapas: a extração lipídica, a saponificação e a derivatização dos ácidos graxos.

4.10.1 Extração lipídica

A extração lipídica do tecido renal (70mg) foi realizada de acordo com o método descrito por FOLCH, LEES e STANLEY (1957), onde ocorre a extração de lipídeos por

solvente extrator (composto por metanol:clorofórmio, 1:2). Após centrifugação e retirada do conteúdo lipídico, foi adicionado 1 mL de Solução de Folch (metanol 48,98%; água 47,96%; clorofórmio 3,06%; MgCl_2 0,017%; CaCl_2 0,02%; NaCl 0,37%), por três vezes, após o infranadante foi submetido à secagem em N_2 .

4.10.2 Saponificação dos extratos lipídicos

Os extratos lipídicos foram ressuspensos em 100 μL de metanol e saponificados com 2 mL de uma solução alcalina em metanol (NaCl 1M em metanol a 90%), a 37°C por 2 horas, em banho-maria com agitação. A solução alcalina foi então acidificada até aproximadamente pH 3,0, com 1,5 mL de HCl 1M. Os ácidos graxos em solução foram extraídos 3 vezes com 2 mL de hexano. O solvente foi evaporado em N_2 .

4.10.3 Derivatização e análise dos ácidos graxos

A reação de derivatização foi baseada no método descrito por ABUSHUFA, REED e WEINKOVE (1994). Com a adição de solução contendo 4-bromometil-7-metóxicoumarina (BMMC) e solução de 18-crown-6 onde as amostras permaneceram a 60°C por 15 minutos em placa aquecedora, e em seguida transferidos para frascos apropriados para injeção (50 μL dos derivados diluídos) em um sistema HPLC – Varian com uma bomba (modelo ProStar 230), a fluxo de 1,0mL/minuto, com fase móvel, em gradiente binário com acetonitrila e água, iniciando com a proporção de 77:23 (acetonitrila:água) e finalizando com 90:10, em um total de 55 minutos. A injeção foi realizada pelo Autoinjeter (modelo ProStar 410) e os compostos foram detectados fluorimetricamente por detector de fluorescência (modelo ProStar 363) (excitação a 325nm e emissão a 398nm). A coluna analítica para a separação dos ácidos graxos derivatizados utilizada foi da marca Varian, Microsorb-MV C-8 de fase reversa, com 250

mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro, contendo partículas de 5µm. O software para integração e registro de dados foi o Star 6.2 Chromatography Wokstation.

4.11 IMUNOHISTOQUÍMICA

4.11.1 Preparo do tecido renal

O rim esquerdo foi seccionado transversalmente e fixado por imersão em solução METHACARN (metanol:clorofórmio:ácido acético glacial na proporção 60:30:10) por 16 horas, em temperatura ambiente. Após o processo de fixação, o material foi desidratado pela passagem em bateria de álcool 70, 80, 90, 95 e duas vezes no 100º, por 1 hora em cada solução. Com o material completamente desidratado, este permaneceu 1 hora em solução álcool 100º/Xilol (1:1), somente Xilol por 1 hora e novamente Xilol por 30 min, para a realização da diafanização. A inclusão foi feita com parafina derretida em estufa a 60°C por 2 horas e após, realizada a emblocagem do material com nova parafina. Secções de 4µm de espessura foram desparafinizadas e seguiu-se o protocolo da imunohistoquímica.

4.11.2 Imunomarcacão

Os anticorpos utilizados para a imunomarcacão foram:

- anticorpo monoclonal de camundongo *anti- α -smooth muscle actin* (α -SMA) (DAKO Corporation, Denmark)*; diluição 1:1000;
- anticorpo monoclonal de camundongo *anti-proliferation cell nuclear antigen* (PCNA); 1:1000 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)***; diluição 1:1000;

- anticorpo monoclonal de camundongo anti-vimentina (DAKO Corporation, Denmark)*; diluição 1:500;
- anticorpo monoclonal de camundongo anti-desmina (DAKO Corporation, Denmark)*; diluição 1:100,
- anticorpo monoclonal de camundongo anti-pJNK (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), 1:30;

Os anticorpos primários foram incubados *overnight* à 4°C (*) ou por 1 hora (**) ou 30min (***) a temperatura ambiente. Seguiu-se a incubação com os anticorpos secundários anti-mouse biotinilados por 30 minutos. A reação foi bloqueada pela utilização de albumina sérica bovina a 1% nas soluções dos anticorpos primários e secundários. O produto da reação foi detectado pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA), a cor desenvolvida com 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), na presença de peróxido de hidrogênio e a intensificação da cor pela adição de cloreto de níquel. A contra-coloração foi feita com *methyl green* para todas as marcações, exceto para as lâminas marcadas anti-pJNK que foram contra-coradas com hematoxilina. As lâminas foram desidratadas e montadas.

A avaliação da imunomarcação da expressão renal de α -SMA intersticial/tubular foi feita por método semiquantitativo (*score*), refletindo a extensão da área do córtex renal marcado (COIMBRA *et al.*, 2000), foi atribuído um *score* de 0 a 4. O *score* 0, equivale a ausência de marcação (0% ou menos que 5%); o *score* 1, marcação discreta focal (5-25%); o *score* 2, marcação moderada focal (25-50%); o *score* 3, marcação acentuada focal (50-75%) e o *score* 4, marcação difusa acentuada (>75%), analisados 50 campos por camundongo. Este mesmo *score* foi atribuído à expressão α -SMA e desmina glomerulares (células mesangiais), sendo analisados 50 glomérulos por camundongo. Foi determinado um *score* médio para cada animal.

A avaliação da imunomarcação para PCNA, pJNK e vimentina foi feita contando-se o número de células positivas, respectivamente, por secção glomerular e por campo de interstício/túbulo para PCNA e pJNK e campo de interstício e de células tubulares para células positivas para vimentina. Foram analisados 50 glomérulos e/ou 50 campos

por animal e determinado o número médio de células positivas para determinada marcação. Resultado expresso como: número de células positivas/glomérulo ou células positivas/ 0.245mm^2 de campo no microscópio (Axio Observer Z1, Carl Zeiss, Germany).

4.12 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTÉICA (*WESTERN BLOTTING*)

4.12.1 Quantificação protéica

Amostras de 100mg do tecido renal foram fragmentadas mecanicamente com o auxílio de um homogeneizador (BOSCH® GGS27 25000 rpm/min) em tampão de lise (Tris base 100mM, EDTA 10mM, SDS 1%, Fluoreto de Sódio 100mM, Pirofosfato de Sódio 10mM, Ortovanadato de Sódio 10mM) na proporção de 1:7, centrifugados durante 7min a 17949g (Eppendorf Centrifuge® 5810 R) e o sobrenadante coletado para a quantificação protéica utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). A técnica baseia-se na ligação do corante Coomassie Blue G-250 à proteína resultando em coloração azul, a qual pode ser detectada em comprimento de onda de 595nm. A concentração de proteínas das amostras foi calculada com base em curva padrão de proteína conhecida (Albumina Sérica Bovina), sendo a leitura realizada em espectrofotômetro da marca Biotek® (Biotek Instruments). O cálculo da concentração protéica de cada amostra foi feito a partir da equação da reta ($y=ax+b$), sendo que y = absorvância e x = concentração de proteína. O valor de x encontrado foi multiplicado pela diluição da amostra para se obter a concentração de proteína da amostra em $\mu\text{g/mL}$.

Após quantificação protéica das amostras, foi realizada diluição das mesmas utilizando tampão de Laemmli 5X (Tris HCl 0,5M, SDS 10%, bromofenol blue 0,5%, glicerol, β -mercaptoetanol 5%) de forma a deixar todas as amostras com a mesma concentração protéica de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. O tampão Laemmli contém SDS (dodecil sulfato de sódio) para desnaturar a proteína e prover carga negativa constante de forma que todas

fiquem com a mesma carga na amostra; glicerol para dar à amostra densidade maior do que o tampão de corrida e β -mercaptoetanol (agente redutor) para desfazer pontes dissulfeto da estrutura protéica, possibilitando a separação da amostra em subunidades.

4.12.2 Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

Este método baseia-se na migração das proteínas quando submetidas a um campo elétrico. Essa migração pode ser feita baseada na massa molecular, carga, formato ou interações com outras moléculas. Em 1970, LAEMMLI descreveu o método SDS-PAGE, pelo qual a migração das proteínas dá-se, principalmente, em virtude de sua massa molecular (LAEMMLI, 1970). Isso é feito pela utilização do detergente SDS que é carregado negativamente e liga-se a regiões hidrofóbicas das proteínas. Esse processo resulta em desnaturação protéica, resultando em longas cadeias de polipeptídeos e conseqüentemente na neutralização protéica. Como várias moléculas de SDS ligam-se à mesma proteína, haverá a atribuição de carga negativa, e quando submetidas a um campo elétrico migrarão para o pólo positivo. Para isso, é utilizado um gel de poliacrilamida, o qual é preparado a 4%, em que a sua concentração e a diferença de pH permitem que todas as proteínas migrem com a mesma velocidade no início da corrida. Ao atingir o gel de separação a migração continua na dependência da massa molecular de cada proteína. Neste gel, a porcentagem de acrilamida foi de 10%, adequado para separar as proteínas; COX-2 (72kDa), AMPK- α 1 (60kDa) e p65 (65kDa) β -actina (43kDa). A polimerização desta mistura iniciou-se pela adição de persulfato de amônio (APS 10%) e TEMED.

Posteriormente o gel foi submetido a uma voltagem constante de 160 V por aproximadamente 80 minutos utilizando o aparato de eletroforese (BIO-RAD® Mini PROTEIN). Esta separação é importante para posterior identificação das proteínas de interesse por *Western Blotting*.

4.12.3 Western Blotting

O método Western Blotting foi descrito por TOWBIN, STAEHELIN e GORDON (1979) e baseia-se na identificação de proteínas específicas pelo uso de anticorpos mono ou policlonais. Após a separação das proteínas em SDS-PAGE, as proteínas foram eletrotransferidas (BIORAD® Semi-dry transfer cell) para uma membrana de nitrocelulose (BIO-RAD® TRANSBLOT) durante aproximadamente 45 min sob uma voltagem constante de 20 V (5,5 mA/cm²), contendo tampão de Transferência Bjerrum and Schafer-Nielsen (48 mM Tris, 39 mM glicina, 10% SDS e 20% metanol) previamente resfriado a 4°C. A membrana foi bloqueada por 1 hora à temperatura ambiente com tampão de bloqueio TBST (NaCl 4M, TrisHCl 1M, 0,05% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado em pó (Molico®, Nestlé) para evitar que anticorpos liguem-se, inespecificamente, em regiões da membrana em que não há proteínas. Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (*Santa Cruz® Biotechnology*), diluídos na proporção de 1:500 a 1:1500 o qual se ligará à proteína que está sendo analisada em tampão de bloqueio 3% a 4°C por 14 horas sob agitação. As membranas, após lavagens com TBST, foram incubadas com anticorpo secundário conjugado diluído na proporção de 1:5000 em tampão de bloqueio 3% por 1 hora à temperatura ambiente. Para as proteínas COX-2, AMPK- α 1 e β -actina, como normalizador das anteriores, anticorpo secundário utilizado era específico para o anticorpo primário ligado a uma enzima HRP (horseradish peroxidase) (*Pierce®*) foi realizado a fim de visualizar a interação antígeno-anticorpo. Pela adição de substrato quimioluminescente (*West Pico Sigma®*) (0,1mL/cm²) pode-se observar em filme Kodak® para radiografia, o sinal correspondente a proteína em questão. Já para a proteína p65 e β -actina, para normalizar, foi utilizado anticorpo secundário específico ao primário, mas conjugado à enzima fosfatase alcalina. Para a visualização das bandas, neste caso, foi utilizado substrato cromógeno para fosfatase alcalina BCIP/NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride, 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphate p-Toluidine Salt, 5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-Phosphatase, Amresco®, AMRESCO LLC, Solon, USA) permanecendo nesta solução até o aparecimento das bandas das proteínas. A

densidade das bandas foi avaliada por densitometria (software Image J[®]), em relação à densidade da banda de um controle interno (β -actina).

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa de estatística utilizado foi o GraphPad Prisma[®] 5.0. Os resultados são reportados como valores médios com erro padrão da média (EPM). Os valores foram submetidos inicialmente por teste de Grubbs para detecção de valores *outliers*. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para determinar a normalidade da amostra. Para análise de dois grupos foi utilizado o teste *t* de *Student*, com distribuição normal e teste Mann-Whitney, quando os dados não seguem uma distribuição Gaussiana. Para se comparar mais de dois grupos foi utilizado a Análise de Variância de uma via seguida do teste do pós-teste de Tukey para os dados com distribuição Gaussiana ou teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns para dados que não assumam esta distribuição normal. O critério de significância estatística se obteve com valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 INDUÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

Os animais inicialmente distribuídos em três grupos experimentais permaneceram recebendo três rações diferentes por oito semanas. A ração padrão constituindo o grupo S, o grupo HC que recebeu dieta rica em carboidrato e o grupo HF que recebeu dieta rica em lipídeos. Após o período de indução do modelo experimental, os animais foram submetidos ao teste de tolerância intraperitoneal à glicose, onde em jejum de 12h, receberam intraperitonealmente solução de glicose (2g/kg p.c.) e a medição da glicemia foi realizada nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min após a injeção de solução de glicose, sendo assim obtida a Curva glicêmica em função do tempo, representada pela FIGURA 5 e os valores apresentados pela TABELA 3.

No tempo 0 min, a glicemia dos grupos HC e HF foi significativamente 22 e 30% maior em comparação ao grupo S ($p<0,001$ e $p<0,0001$, respectivamente). Nos tempos 30, 60 e 90 min, somente o consumo da ração hiperlipídica gerou aumento da glicemia em relação tanto ao grupo S, quanto ao grupo HC (tempo 30/60/90 min: HF vs S, $p<0,0001$; Tempo 30: HF vs HC, $p<0,001$; Tempo 60/90: HF vs HC, $p<0,0001$). Já na glicemia final (tempo 120 min), os grupos HF e HC apresentaram aumento na glicemia em comparação com o grupo S e entre si, sendo o grupo HF o que apresentou a maior glicemia final em relação à ração rica em carboidrato (HC vs S, $p<0,05$; HF vs S, $p<0,0001$; HF vs HC, $p<0,0001$).

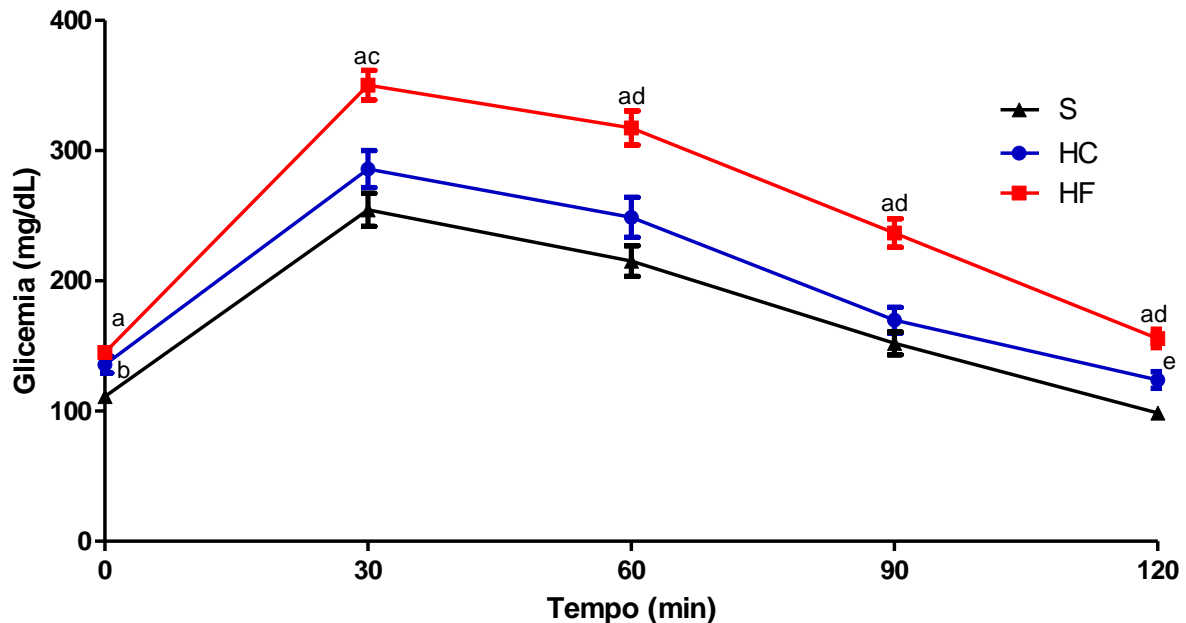


FIGURA 5 Curva glicêmica (mg/dL) vs tempo (min) a partir do teste de tolerância intraperitoneal à glicose realizado após 8 semanas de dieta dos grupos ração padrão (S) (n=32), com ração rica em carboidrato (HC) (n=32) e em lipídeos (HF) (n=56). Dados expressos em média \pm EPM. a $p < 0,0001$ vs S; b $p < 0,001$ vs S; c $p < 0,001$ vs HC; d $p < 0,0001$ vs HC; e $p < 0,05$ vs S (realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey).

TABELA 3 Curva glicêmica (mg/dL) vs tempo (min) a partir do teste de tolerância intraperitoneal à glicose realizado após 8 semanas de dieta dos grupos ração padrão (S) (n=32), com ração rica em carboidrato (HC) (n=32) e em lipídeos (HF) (n=56). Dados expressos em média \pm EPM.

Glicemia (mg/dL)	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
S (n=31)	111,2 \pm 4,635	254,5 \pm 12,64	215,3 \pm 11,75	147,2 \pm 7,644	98,53 \pm 4,044
HC (n=33)	135,7 \pm 6,400 ^a	285,9 \pm 14,23	240,2 \pm 13,08	169,8 \pm 9,825	123,8 \pm 6,438 ^g
HF (n=58)	145,0 \pm 3,602 ^b	350,4 \pm 11,37 ^{de}	317,4 \pm 13,05 ^{bc}	236,8 \pm 10,91 ^{af}	155,7 \pm 6,967 ^{dg}

Dados expressos em média \pm EPM. a $p < 0,001$ vs S; b $p < 0,0001$ vs S; c $p < 0,0001$ vs HC; d $p < 0,0001$ vs S; e $p < 0,001$ vs HC; f $p < 0,001$ vs HC; g $p < 0,05$ vs S; h $p < 0,05$ vs HC (a, b, c, f, realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey; d, e, g, h teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn).

Com a curva do teste de tolerância à glicose é possível calcular a área sob a curva (AUC – *area under curve*) representada pela taxa de decaimento da glicemia (mg/dL) *versus* tempo (min) e que representa o grau de intolerância à glicose, sendo que quanto menor a AUC mais tolerante e quanto maior a AUC mais intolerante à glicose é o indivíduo. A partir da curva formada pelo teste de tolerância à glicose é traçada uma reta do ponto da glicemia basal ao ponto da glicemia final (tempo 120 min) e calculada a área sob a curva. A AUC representa a taxa de decaimento da glicose por

unidade de tempo, quanto mais rápido ela voltar aos valores basais, menor será a AUC e maior sensibilidade à insulina apresenta o indivíduo. O grau de intolerância à glicose está fortemente relacionada com a aumento da resistência à insulina, um dado representativo do quadro do diabetes tipo 2.

A AUC foi alterada somente no grupo que recebeu dieta rica em lipídeos (35205±1435mg/dL x min), sendo aproximadamente 60% maior que o grupo S (21953±1032mg/dL x min) e 51% maior que o grupo HC (23356±1092mg/dL x min), como demonstrado pela FIGURA 6.

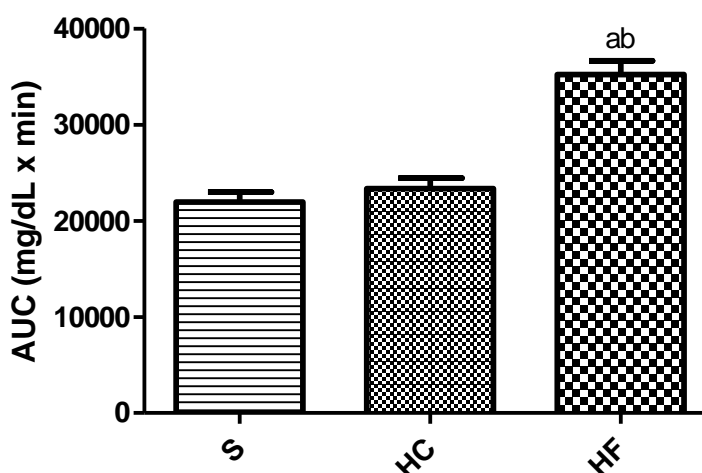


FIGURA 6 Área sob a curva (AUC – area under curve) a partir da Curva glicêmica (mg/dL) vs tempo (min) do teste de tolerância intraperitoneal à glicose realizado após 8 semanas de dieta dos grupos ração padrão (S) (n=31), com ração rica em carboidrato (HC) (n=27) e em lipídeos (HF) (n=37). Dados expressos em média ± EPM. a $p < 0,0001$ vs S; b $p < 0,0001$ vs HC (realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey).

As dietas ricas em carboidratos ou em lipídeos foram capazes de gerar maior ganho de peso após oito semanas de seu consumo. Como representado na TABELA 4, o peso inicial dos animais dos grupos S, HC e HF não apresentaram diferenças significativas entre si. Na comparação entre o valor bruto do peso final, somente a dieta HF elevou este parâmetro em relação aos dois outros grupos ($p < 0,0001$ vs S; $p < 0,001$ vs HC). Mas quando avaliamos o ganho de peso, ou seja, a porcentagem do aumento do peso nas oito semanas em relação ao peso do início do consumo, vemos que os

grupos com dietas modificadas, HC e HF apresentaram um ganho de peso significativo em relação à dieta regular (S) (S vs HC e HF, $p<0,0001$) e entre si (HC vs HF, $p<0,0001$).

A média de consumo das diferentes rações também está descrita na TABELA 4. Esta análise foi realizada pesando as rações oferecidas no dia e no dia seguinte mensurando o quanto foi consumido pelos animais por caixa, contendo em média de 5 a 6 indivíduos, por isso esta análise é somente uma estimativa do consumo. Ao analisar o consumo das rações em gramas ou em valor energético percebemos que o consumo das dietas ricas em carboidratos e em lipídeos é menor em relação ao grupo S. A média do consumo em gramas da ração HC e da HF foram 18 e 58% menores, respectivamente, do que o consumo da ração *standard* ($p<0,0001$), além disso a dieta HF ainda apresentou praticamente metade do consumo da HC ($p<0,0001$).

TABELA 4 Peso inicial (g), final (g) e porcentagem de ganho de peso em relação ao peso inicial e média do consumo diário de ração por animal em gramas e em kcal durante as 8 semanas das dietas nos grupos ração padrão (S), ração rica em carboidrato (HC) e rica em lipídeos (HF).

Grupos	S	HC	HF
Peso inicial (g)	35,95±0,6516 (n=59)	35,60±0,4030 (n=122)	34,52±0,3615 (n=176)
Peso final (g)	42,53±0,7140 (n=59)	44,07±0,5079 (n=122)	46,72±0,5263 ^{ab} (n=176)
Ganho de peso (%)	18,73±1,579 (n=59)	24,86±1,383 ^c (n=122)	35,50±1,351 ^{cd} (n=176)
Consumo de ração (g)	9,638±0,5298 (n=8)	7,925±0,2027 ^a (n=12)	4,067±0,1196 ^{ae} (n=24)
Consumo de ração (kcal)	32,66±1,805 (n=8)	20,13±0,5150 ^a (n=12)	21,48±0,6352 ^a (n=24)

Dados expressos em média ± EPM. a $p<0,0001$ vs S; b $p<0,001$ vs HC; c $p<0,0001$ vs S; d $p<0,0001$ vs HC; e $p<0,0001$ vs HC (a, b, e realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey; c, d realizado teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn).

Quando analisamos a média do consumo pelo valor energético verificamos um perfil de consumo semelhante ao anterior, onde houve uma média de consumo 39 e 34% menores entre as dietas HC e HF, respectivamente, em relação ao grupo S ($p<0,0001$). Não houve diferenças em valor energético entre a ração HC e HF. O maior consumo da dieta padrão pode ser devido à sua composição, visto que há presença de

amido não purificado e maior conteúdo de fibras, com menor valor energético total comparado às dietas HC e HF.

5.2 RESULTADOS APÓS SUPLEMENTAÇÃO

Após o consumo das rações por 8 semanas, os grupos S, HC e HF foram distribuídos em 3 subgrupos para receber suplementações com óleo de peixe ou óleo de girassol por 4 semanas conjuntamente com o consumo das suas respectivas rações, até a 12ª semana.

5.2.1 Ganho de peso

Os animais dos grupos experimentais foram pesados semanalmente para avaliar o ganho de peso durante as quatro semanas de suplementação. O peso inicial, peso final e a porcentagem de ganho peso durante o período de suplementação estão representados na TABELA 5.

No peso inicial verificamos que a dieta hiperlipídica já inicia com valores acima que o grupo S em 7%. Essa diferença aumenta para 8% no peso final, mas quando analisamos o ganho de peso essa diferença não aparece. Assim, podemos perceber que a média do peso dos animais aumentou principalmente nas semanas de indução da dieta (primeiras 8 semanas) não apresentando grandes variações no ganho de peso nas últimas 4 semanas.

TABELA 5 Peso inicial (g), final (g) e porcentagem de ganho de peso em relação ao peso inicial durante 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG), e com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com as mesmas suplementações (HCOP, HCOG e HFOP, HFOG).

Grupos	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho de peso (%)
S (n=43)	43,63±0,8412	46,02±0,8461	5,696±0,7781
SOP (n=38)	43,74±0,8581	44,58±0,7763	2,203±0,7431 ⁱ
SOG (n=10)	44,70±1,415	46,20±1,381	3,446±1,139
HC (n=48)	46,41±0,9888	49,27±1,143	6,124±0,9847
HCOP (n=52)	44,02±0,7813	46,98±0,8577	6,838±0,7777 ^b
HCOG (n=23)	41,09±0,8195 ^e	42,74±1,106 ^h	3,841±1,115
HF (n=57)	46,90±0,8195 ^a	49,96±1,216 ^a	6,428±1,003
HFOP (n=52)	47,79±0,9903 ^{bc}	50,73±1,034 ^{tg}	6,499±0,9715 ^b
HFOG (n=23)	48,13±1,303 ^d	52,09±1,777 ^d	8,050±1,862

Dados expressos em média ± EPM. a p<0,05 vs S; b p<0,01 vs SOP; c p<0,01 vs HCOP; d p<0,001 vs HCOG; e p<0,01 vs HC; f p<0,001 vs SOP; g p<0,05 vs HCOP; h p<0,01 vs HC; i p<0,01 vs S; (a, b, c, e, i realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey e d, f, g, h teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn).

O peso final dos animais que receberam dieta HF e suplementação com óleo de peixe foi 14% e 7% maior que seu controle com dieta padrão ou dieta rica em carboidrato, respectivamente, (HFOP vs SOP; p<0,001, HFOP vs HCOP; p<0,05). No grupo com suplementação do OG, o peso final foi 21% maior que a mesma suplementação com dieta rica em carboidrato (HFOG vs HCOG, p<0,001). Agora, ao analisar o ganho de peso destes animais, não são todas estas diferenças que se mantêm, já que ganho de peso representa uma relação do peso inicial e do final, e alguns grupos por apresentarem peso inicial maior, geraram maior peso final, mas com uma porcentagem de ganho semelhante a de outros grupos. Perceberam-se aumentos significativos em relação ao HFOP comparado ao SOP (p<0,01), como citado anteriormente, e ganho de peso 3x maior do grupo HCOP em relação ao SOP (p<0,01), aumento este não mostrado com os valores brutos de peso final.

Além disso, verificamos que entre os grupos que receberam dieta rica em carboidrato, os animais suplementados com óleo de girassol começam a suplementação com peso inicial 12% menor que seu grupo sem suplementação (HCOG vs HC, p<0,01), e apresentam um peso final 13% menor em relação ao mesmo grupo (HCOG vs HC, p<0,01). Desta forma, terminam com ganho de peso igual ao HC. O óleo de peixe não apresentou ação no aumento dos pesos ou no ganho de peso das dietas modificadas, mas apresentou redução de 40% na porcentagem do ganho de peso na

dieta padrão (SOP vs S, $p<0,01$).

5.2.2 Curva glicêmica a partir do teste de tolerância intraperitoneal à glicose

A curva glicêmica produzida a partir do teste de tolerância intraperitoneal à glicose, representada pela FIGURA 7, é mostrada para avaliar de forma global o teste realizado. A análise estatística realizada está demonstrada na TABELA 6, com os valores das glicemias em diferentes tempos do teste. A partir dos dados desta tabela podemos perceber que o óleo de peixe sozinho não reduziu a glicemia em nenhum dos tempos analisados, mas não permitiu aumento da glicemia basal entre as dietas analisadas (SOP, HCOP e HFOP, sem diferenças no tempo 0 em relação entre si), fato que não ocorreu pela suplementação com OG.

As principais diferenças que encontramos nas glicemias nos diferentes tempos foram entre as dietas experimentais e a suplementação com óleo de girassol, este principalmente comparando-se no grupo que recebeu dieta padrão (S). O óleo de girassol aumentou a glicemia comparada ao grupo S nos tempos 30 e 60 min (SOG vs S; $p<0,001$ e $p<0,01$, respectivamente) e no tempo 120 min nos grupos HF (HFOG vs HF, $p<0,05$). Quando analisamos o papel das dietas, vemos que a dieta HF aumentou a glicemia em diversos tempos comparando-se com a dieta padrão e comparando com a dieta rica em carboidratos nos grupos sem ou com as mesmas suplementações. A dieta rica em carboidrato aumentou a glicemia somente no grupo suplementado com óleo de girassol na glicemia basal em relação ao mesmo grupo com dieta padrão (HCOG vs SOG, $p<0,01$). A dieta rica em lipídeos aumentou a glicemia comparado à dieta padrão nos tempos 0 ($p<0,01$), 30, 60, 90 ($p<0,0001$) e 120 min ($p<0,01$). A dieta HF comparado à dieta rica em carboidrato aumentou a glicemia nos tempos 30, 60 ($p<0,0001$) e 90 min ($p<0,001$). Dentre os grupos com dieta hiperlipídica, as suplementações com OP e OG modificaram a glicemia em comparação aos respectivos grupos com dietas S e HC nos tempos 0 (HFOG vs SOG, $p<0,001$), tempo 30 min (HFOP vs SOP e HCOP, $p<0,0001$; HFOG vs SOG, $p<0,001$; HFOG vs HCOG,

$p < 0,0001$), tempo 60 min (HFOP vs SOP e HCOP, $p < 0,0001$; HFOG vs SOG, $p < 0,01$; HFOG vs HCOG, $p < 0,001$), tempo 90 min (HFOP vs SOP, $p < 0,0001$; HFOP vs HCOP, $p < 0,001$; HFOG vs SOG e HCOG, $p < 0,0001$) e no tempo 120 min (HFOP vs SOP, $p < 0,01$; HFOP vs HCOP, $p < 0,001$; HFOG vs SOG, $p < 0,0001$; HFOG vs HCOG, $p < 0,001$).

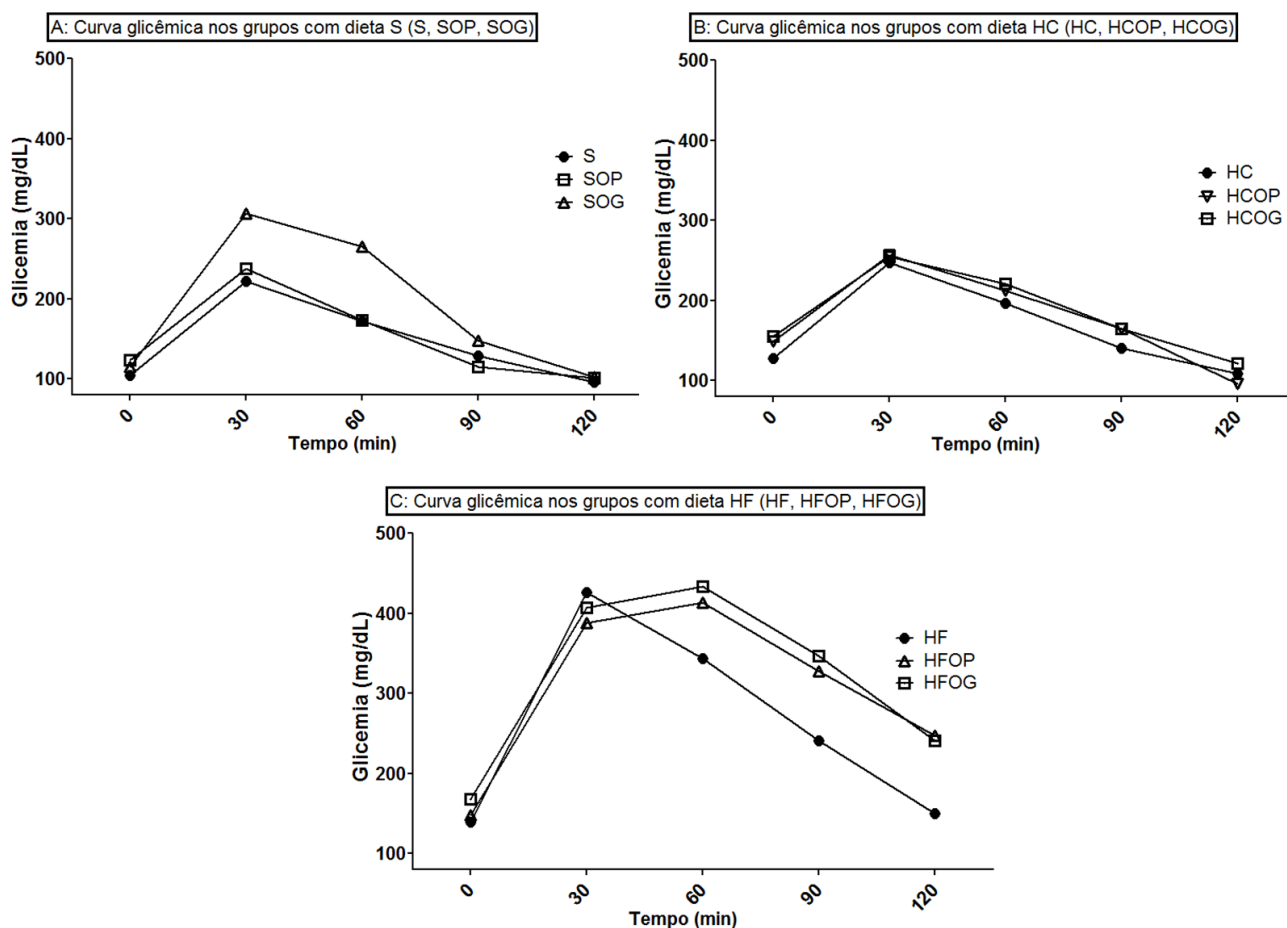


FIGURA 7

Curva glicêmica (mg/dL) vs tempo (min) a partir do teste de tolerância intraperitoneal à glicose realizado após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG) (A), com ração rica em carboidrato (HC) ($n=10$) e suas suplementações (HCOP e HCOG) (B) e ração rica em lipídeos (HF) e com as mesmas suplementações (HFOP e HFOG) (C). Dados expressos em média \pm EPM.

TABELA 6 Curva glicêmica (mg/dL) vs tempo (min) a partir do teste de tolerância intraperitoneal à glicose realizado após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG), e com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com as mesmas suplementações (HCOP, HCOG e HFOP, HFOG).

Glicemia (mg/dL)	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
S (n=13)	104,5±5,485	221,5±14,95	172,6±14,78	129,2±12,31	95,92±8,221
SOP (n=9)	123,3±11,2	237,8±21,79	173,1±16,78	114,7±10,75	100,9±8,579
SOG (n=10)	115,3±7,551	306,8±20,86 ^d	265,3±28,3 ^a	148,1±9,728	102,1±7,167
HC (n=10)	128,2±10,05	247,6±17,8	196,4±20,00	140,5±15,48	109,1±12,88
HCOP (n=12)	149,2±7,055	256,9±19,55	211,9±14,33	164,9±14,74	96,42±7,137
HCOG (n=8)	154,9±8,016 ^b	255,1±14,55	220,9±25,25	164,6±7,618	121,4±6,874
HF (n=14)	139,6±6,177 ^a	425,9±13,81 ^{gh}	343,3±23,2 ^{gh}	240,5±22,51 ^{gm}	150,4±17,23 ^r
HFOP (n=10)	147,9±12,74	387,7±11,89 ^{ef}	413,9±32,35 ^{jk}	328,0±48,22 ⁱⁿ	247±48,58 st
HFOG (n=10)	167,9±9,934 ^c	406,8±23,65 ^{ci}	433,6±41,13 ^{bl}	347,0±35,27 ^{io}	241,5±34,27 ^{lop}

Dados expressos em média ± EPM. a p<0,01 vs S; b p<0,01 vs SOG; c p<0,001 vs SOG; d p<0,001 vs S; e p<0,0001 vs SOP; f p<0,0001 vs HCOP; g p<0,0001 vs S; h p<0,0001 vs HC; i p<0,0001 vs HCOG; j p<0,0001 vs SOP; k p<0,0001 vs HCOP; l p<0,001 vs HCOG; m p<0,001 vs HC; n p<0,001 vs HCOP; o p<0,0001 vs SOG; p p<0,05 vs HF; r p<0,01 vs S; s p<0,01 vs SOP; t p<0,001 vs HCOP (a, b, c, g, h, i, j, k, l, m, n e o realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey e d, e, f, p, r, s e t teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn).

Na FIGURA 8 está representada a AUC dos grupos experimentais e podemos notar que a dieta rica em lipídeos é a única capaz de aumentar este parâmetro em relação às outras duas dietas em paralelo. O grupo HF (34579±1876mg/dL x min) foi maior aproximadamente 84% e 65% que os grupos S (18707±1282mg/dL x min) e HC (20952±1575mg/dL x min), respectivamente (p<0,0001).

Ao verificarmos as diferenças das dietas dentre os grupos com suplementações, perceberemos o mesmo padrão citado, onde os grupos com dieta HF e suplementações com OP (HFOP - 40000±3411mg/dL x min) aumentou 109% e 79% em relação à SOP (19128±1326mg/dL x min) e HCOP (22271±1575mg/dL x min), respectivamente (p<0,0001), e o OG aumentou 68% e 75% comparado com SOG (24867±1605mg/dL x min) (p<0,05) e HCOG (23930±1420mg/dL x min) (p<0,01), respectivamente.

Quando avaliamos o papel das suplementações nas suas respectivas dietas, perceberemos que o óleo de peixe não foi capaz de melhorar a AUC em nenhuma dieta, mas o OG (SOG) gerou piora na AUC no grupo S com aumento de 32% neste parâmetro (valores citados anteriormente) (p<0,01).

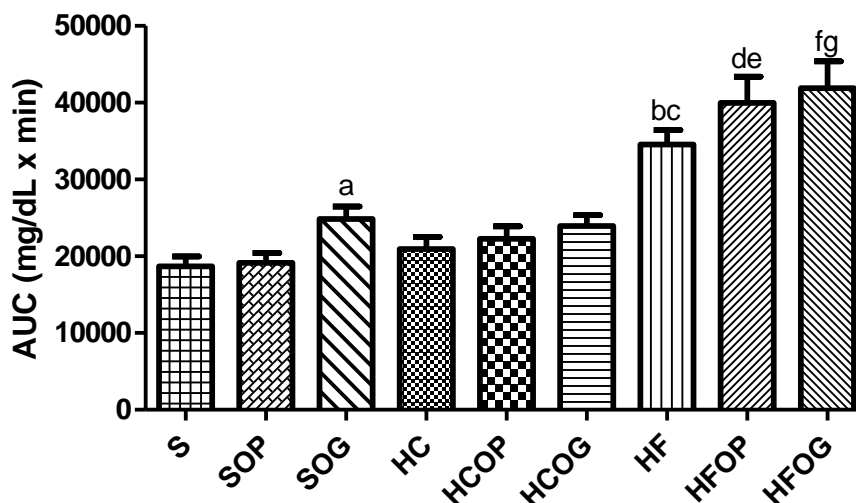


FIGURA 8 Área sob a curva (AUC – area under curve) a partir da curva glicêmica (mg/dL) vs tempo (min) do teste de tolerância intraperitoneal à glicose realizado após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=13) com óleo de peixe (SOP) (n=9) ou óleo de girassol (SOG) (n=10), e com ração rica em carboidrato (HC) (n=10) ou em lipídeos (HF) (n=15) com as mesmas suplementações [HCOP (n=12), HCOG (n=9) e HFOP (n=11), HFOG (n=11)]. Dados expressos em média \pm EPM. a $p < 0,01$ vs S; b $p < 0,0001$ vs S; c $p < 0,0001$ vs HC; d $p < 0,0001$ vs SOP; e $p < 0,0001$ vs HCOP; f $p < 0,05$ vs SOG; g $p < 0,05$ vs HCOG; h $p < 0,01$ vs HF (a, b, c, d, e realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey; f, g teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn).

A insulina plasmática em jejum de 12 horas foi realizada em todos os grupos experimentais. Entre as três dietas, nos grupos sem suplementações, não houve diferenças significativas entre S ($0,4429 \pm 0,01256 \text{ ng/mL}$), HC ($1,099 \pm 0,3503 \text{ ng/mL}$) e HF ($0,8284 \pm 0,1082 \text{ ng/mL}$) (FIGURA 9). A comparação das dietas dentre os grupos suplementados com óleo de peixe, temos que a HFOP ($1,140 \pm 0,2720 \text{ ng/mL}$) aumentou 161% em relação ao grupo SOP ($0,4353 \pm 0,003107 \text{ ng/mL}$) ($p < 0,05$) e 230% em relação ao grupo HCOP ($0,3471 \pm 0,04131 \text{ ng/mL}$) ($p < 0,05$). Dentre os grupos suplementados com óleo de girassol, o mesmo padrão foi encontrado com aumentos de 5x o valor de SOG (HFOG vs SOG, $p < 0,01$, sendo SOG $0,6310 \pm 0,08816 \text{ ng/mL}$ e HFOG $3,209 \pm 0,8476 \text{ ng/mL}$) e de mais de 3x o valor de HCOG (HFOG vs HCOG, $p < 0,05$; sendo HCOG $0,9427 \pm 0,3015 \text{ ng/mL}$). Ao analisarmos os possíveis efeitos das suplementações sobre as dietas, vemos que o óleo de peixe não modificou significativamente a insulina dos animais em nenhuma dieta. Já a suplementação com óleo de girassol sozinho aumentou 42% a insulina plasmática no grupo com dieta

padrão (SOG vs S, $p<0,05$; dados já citados) e mais que triplicou os valores em relação à dieta rica em lipídeos (HFOG vs HF, $p<0,01$; dados já citados).

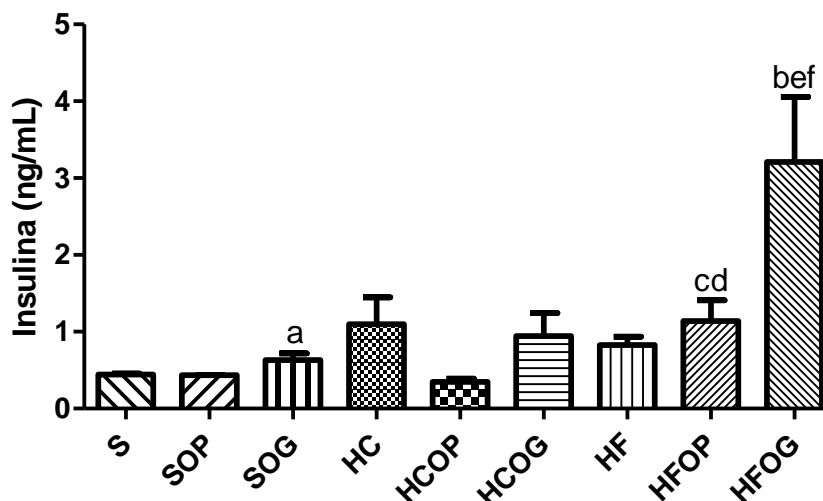


FIGURA 9 Insulinemia dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=7), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=7) ou óleo de girassol (SOG) (n=10), e com ração rica em carboidrato (HC) (n=10) ou em lipídeos (HF) (n=11) e com as mesmas suplementações [HCOP (n=9), HCOG (n=10) e HFOP (n=10), HFOG (n=10)]. Dados expressos em média \pm EPM. a $p<0,05$ vs S; b $p<0,01$ vs HF; c $p<0,05$ vs SOP; d $p<0,05$ vs HCOP; e $p<0,01$ vs SOG; f $p<0,05$ vs HCOG. (a, e, f foram analisados por teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn; b, c, d por análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey).

5.2.3 Média dos pesos do rim e dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal e índice de adiposidade

O rim, a tibia e os tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal dos animais, após o período de suplementação completar 4 semanas, foram retirados, pesados e o rim guardado para posteriores análises. Os valores destes parâmetros estão registrados na TABELA 7. O peso do rim foi significativamente menor (redução de aproximadamente 10%) com o consumo da dieta rica em carboidratos em relação à dieta padrão (HC vs S, $p<0,01$). Os grupos alimentados com ração rica em carboidratos e rica em lipídeos e suplementados com óleo de peixe (HCOP e HFOP, respectivamente) apresentaram valores aproximadamente 14% menores do peso do rim comparado ao grupo SOP ($p<0,0001$). Já nas dietas com suplementação com óleo

de girassol, foi verificado que o grupo HFOG apresentou aumento de 4% e 24% em relação ao grupo SOG ($p<0,01$) e HCOG ($p<0,0001$), respectivamente. Quando analisamos o papel isolado das suplementações, percebemos dois quadros: redução de 15% do peso do rim pelo óleo de girassol no grupo com consumo de dieta rica em carboidrato (HCOG vs HC, $p<0,01$) e de 10% pelo óleo de peixe no grupo com dieta rica em lipídeos (HFOP vs HF, $p<0,01$).

TABELA 7 Peso do rim (g), relação peso do rim pelo comprimento da tíbia (g/mm), peso dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal e o índice de adiposidade após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG), e com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com as mesmas suplementações (HCOP, HCOG e HFOP, HFOG).

Grupos	Rim (g)	Rim (g) / Tíbia (mm)	TA Epididimal (g)	TA Retroperitoneal (g)	Índice de adiposidade
S	0,2942±0,007912 (n=40)	0,01374±0,0004063 (n=40)	0,9299±0,08857 (n=40)	0,4141±0,04172 (n=39)	2,794±0,2263 (n=39)
SOP	0,2947±0,007159 (n=35)	0,01392±0,0003389 (n=35)	0,7861±0,07371 (n=35)	0,3369±0,02872 (n=34)	2,358±0,1687 (n=33)
SOG	0,2686±0,01252 (n=10)	0,01254±0,0004787 (n=10)	0,9589±0,1365 (n=10)	0,4628±0,06171 (n=10)	2,741±0,2618 (n=9)
HC	0,2629±0,005746 ^a (n=45)	0,01240±0,0002438 ^g (n=45)	1,992±0,1236 ⁱ (n=44)	0,9523±0,07440 ⁱ (n=44)	5,813±0,2957 ^r (n=44)
HCOP	0,2543±0,007036 ^b (n=49)	0,01212±0,0003572 ^h (n=49)	1,725±0,09638 ^j (n=50)	0,7730±0,05099 ^b (n=49)	5,352±0,2527 ^b (n=50)
HCOG	0,2257±0,007597 ^e (n=23)	0,01138±0,0003956 (n=23)	1,575±0,09409 ⁱ (n=23)	0,6984±0,07079 ^o (n=23)	5,223±0,2449 ⁱ (n=23)
HF	0,2806±0,006573 (n=54)	0,01330±0,0003234 (n=54)	2,313±0,1306 ⁱ (n=54)	0,9821±0,07042 ⁱ (n=53)	6,252±0,2518 ^r (n=53)
HFOP	0,2537±0,005131 ^{bf} (n=49)	0,01211±0,0002654 ^h (n=49)	2,252±0,1296 ^{jk} (n=50)	1,256±0,06487 ^{bnp} (n=50)	6,913±0,3178 ^{bn} (n=50)
HFOG	0,2818±0,009893 ^{cd} (n=22)	0,01264±0,0004868 (n=22)	2,033±0,1105 ^{lm} (n=21)	1,174±0,09006 ^{dl} (n=22)	6,499±0,3048 ^{ln} (n=21)

Dados expressos em média ± EPM. a $p<0,01$ vs S; b $p<0,0001$ vs SOP; c $p<0,01$ vs SOG; d $p<0,0001$ vs HCOG; e $p<0,01$ vs HC; f $p<0,01$ vs HF; g $p<0,05$ vs S; h $p<0,001$ vs SOP; i $p<0,0001$ vs S; j $p<0,0001$ vs SOP; k $p<0,01$ vs HCOP; l $p<0,0001$ vs SOG; m $p<0,001$ vs HCOG; n $p<0,0001$ vs HCOP; o $p<0,05$ vs HC; p $p<0,01$ vs HF; r $p<0,0001$ vs S; (a, b, c, d, e, f, g, h, i, m, n, o, r realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey; i, j, k, p usado teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn).

Para tornar os valores do peso do rim mais condizentes com os grupos experimentais estudados, normalizamos estes pesos pelo comprimento da tíbia de cada animal, para retirar dos valores brutos a variação de ganho de peso de cada indivíduo, que poderia gerar aumento do peso do tecido. Ao analisarmos, então, o peso do rim

normalizado pelo comprimento da tíbia percebemos que a dieta rica em carboidratos continua reduzindo (ainda em 10%) o peso deste tecido, comparado ao grupo S (HC vs S, $p<0,05$). Dentre os grupos suplementados, mas ainda comparando-se o papel das diferentes dietas, verificamos que os grupos HCOP e HFOP reduziram em 13% o valor do peso do rim normalizado pela tíbia comparando ao grupo SOP ($p<0,001$). Não foram encontradas outras diferenças significativas.

No caso do peso dos tecidos adiposos, em uma forma global, percebemos que a dieta rica em carboidrato gerou elevação do peso dos tecidos adiposos em comparação ao grupo com dieta padrão, entretanto, a dieta rica em lipídeos aumentou o peso destes mesmos tecidos tanto em comparação com a dieta padrão, como com a dieta rica em carboidrato. No peso do tecido adiposo (TA) epididimal vemos que o grupo HC e o HF aumentaram 114 e 118% em relação ao grupo S ($p<0,0001$), respectivamente. As dietas mantiveram o mesmo padrão entre as suplementações com algumas diferenças. O aumento do peso do TA epididimal nos grupos HCOP e HFOP foi de 119 e 186% em relação ao grupo SOP ($p<0,0001$), respectivamente, e aumento de 30% pelo grupo HFOP em comparação ao grupo HCOP ($p<0,01$). Já nos grupos com suplementação com OG, temos que os grupos HCOG e HFOG aumentaram 64 e 112% em relação ao grupo SOG ($p<0,0001$), respectivamente, e o grupo HFOG aumentou em aproximadamente 30% este mesmo parâmetro em comparação com o grupo HCOG ($p<0,001$).

O mesmo padrão de acúmulo de tecido adiposo foi visto sobre o peso do TA retroperitoneal. As dietas HC e HF acresceram em 114 e 137% em relação ao grupo S ($p<0,0001$), respectivamente. Dentre os grupos suplementados, verificamos que as dietas HC e HF com suplementação com OP (HCOP e HFOP) apresentaram maiores valores se comparado com a dieta padrão com a mesma suplementação, em 119 e 272%, e com óleo de girassol, em 50 e 153% (HCOP e HFOP vs SOP, $p<0,0001$; HCOG e HFOG vs SOG, $p<0,0001$), respectivamente. Em relação a diferenças entre as dietas HC e HF, houve aumentos de 62 e 69% nos grupos HFOP e HFOG em relação ao HCOP e HCOG, respectivamente ($p<0,0001$). Além das diferenças entre as dietas, no caso do TA retroperitoneal, o óleo de girassol reduziu em 10% o peso deste tecido nos grupos que receberam dieta rica em carboidrato (HCOG vs HC, $p<0,05$) e o óleo de

peixe aumentou em 27% este mesmo parâmetro nos grupos com dieta hiperlipídica (HFOP vs HF, $p<0,01$) (TABELA 7).

O índice de adiposidade é uma relação entre os pesos dos tecidos adiposos normalizando com o peso corporal. Este índice é usado como uma comparação em porcentagem de quanto representam os tecidos adiposos, no caso epididimal e retroperitoneal, no peso total do animal, ou seja, quanto maior o índice, maior a porcentagem de gordura corporal este animal apresenta (TAYLOR; PHILLIPS, 1996). Ainda na TABELA 7, observamos que não houve modificações nas diferenças encontradas entre em relação as que aparecem para o TA epididimal. Os grupos HC e HF foram maiores em aproximadamente 110 e 125%, respectivamente, em relação ao grupo S ($p<0,0001$). Dentre os grupos com suplementação, vemos que os grupos HCOP e HFOP e os HCOG e HFOG aumentaram 126, 193, 90 e 137% em relação aos seus respectivos grupos com dieta padrão SOP e SOG (HCOP e HFOP vs SOP, $p<0,0001$; HCOG e HFOG vs SOG, $p<0,0001$). Além disso, o grupo com dieta hiperlipídica foi maior em relação ao com dieta rica em carboidrato, HFOP aumentou em 29% em comparação com HCOP ($p<0,0001$) e o HFOG foi maior 24% em relação ao HCOG ($p<0,001$).

5.2.4 Glicemia em jejum, triacilgliceróis, colesterol total e suas frações

A dosagem da glicemia em jejum e dos lipídeos séricos foi realizada a partir da quarta semana de suplementação e os valores estão descritos na TABELA 8. Em relação aos valores da glicemia em jejum, as dietas rica em carboidrato e rica em lipídeos apresentaram papel importante aumentando a glicemia nestes grupos com ou sem suplementação. Dentre os grupos não suplementados, o grupo HC e o HF aumentaram, respectivamente, em 64 e 71% este parâmetro em relação ao grupo S ($p<0,0001$). Nos grupos suplementados com óleo de peixe, o grupo HFOP elevou a glicemia em 82 e 34% em comparação ao grupo SOP ($p<0,0001$) e HCOP ($p<0,01$), respectivamente. Já nos grupos com suplementação com óleo de girassol, temos que

os grupos HCOG e HFOG tiveram a glicemia 54 ($p<0,01$) e 100% ($p<0,001$) maiores em comparação ao grupo SOG, respectivamente. O grupo HFOG foi maior em 28% neste mesmo parâmetro em relação ao HCOG ($p<0,05$). A única alteração causada pela suplementação foi o aumento em 40% ($p<0,01$) deste mesmo parâmetro do grupo HFOG em relação ao seu controle sem suplementação (HF). O OP foi capaz de auxiliar no não aumento da glicemia em jejum no grupo HCOP em relação ao seu controle SOP.

Os valores de triacilgliceróis sofreram poucas modificações em relação ao modelo experimental proposto. O grupo HCOG reduziu em 55% a triacilglicerolemia em comparação ao seu controle sem suplementação (HC) ($p<0,001$). Não foram encontradas outras diferenças significativas.

TABELA 8 Glicemia em jejum (mg/dL) e triacilgliceróis (mg/dL), colesterol total (mg/dL), LDL - colesterol (mg/dL) e HDL - colesterol (mg/dL) plasmáticos após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG), e com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com as mesmas suplementações (HCOP, HCOG e HFOG).

Grupos	Glicemia em jejum (mg/dL)	Triacilgliceróis (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)	LDL - colesterol (mg/dL)	HDL - colesterol (mg/dL)
S	82,95±5,048 (n=22)	82,10±10,91 (n=23)	58,01±2,613 (n=21)	28,50±3,134 (n=21)	20,12±2,745 (n=18)
SOP	87,64±5,919 (n=18)	94,87±10,54 (n=18)	61,36±4,256 (n=16)	19,99±5,442 (n=15)	29,22±3,317 (n=14)
SOG	99,83±5,444 (n=10)	55,81±7,289 (n=10)	86,19±3,407 ^l (n=10)	51,26±3,964 ^l (n=10)	23,76±3,467 (n=10)
HC	136,8±11,98 ^a (n=24)	87,87±10,07 (n=24)	90,97±7,149 ^a (n=24)	33,02±5,761 (n=16)	38,50±3,582 ^m (n=19)
HCOP	118,8±10,91 (n=26)	74,27±6,858 (n=26)	76,10±4,683 (n=26)	20,61±2,785 (n=22)	50,79±3,578 ^{np} (n=21)
HCOG	154,5±8,998 ^d (n=20)	39,69±2,206 ^h (n=19)	86,21±4,460 (n=20)	24,14±2,583 ^e (n=20)	53,43±2,881 ^{oq} (n=20)
HF	142,4±9,033 ^a (n=29)	71,14±7,053 (n=29)	82,35±3,816 ^a (n=29)	33,48±4,588 (n=19)	38,93±3,151 ^m (n=23)
HFOP	159,8±10,86 ^{bc} (n=28)	70,67±5,907 (n=28)	85,36±6,001 ⁱ (n=28)	23,97±3,647 (n=17)	47,92±3,659 ⁿ (n=22)
HFOG	199,0±14,25 ^{efg} (n=17)	51,08±4,779 (n=17)	90,56±5,041 (n=16)	32,80±5,323 ^k (n=15)	57,22±3,506 ^{or} (n=17)

Dados expressos em média ± EPM. a $p<0,0001$ vs S; b $p<0,0001$ vs SOP; c $p<0,01$ vs HCOP; d $p<0,01$ vs SOG; e $p<0,001$ vs SOG; f $p<0,05$ vs HCOG; g $p<0,01$ vs HF; h $p<0,001$ vs HC; i $p<0,05$ vs SOP; j $p<0,001$ vs S; k $p<0,05$ vs SOG; l $p<0,001$ vs S; m $p<0,0001$ vs S; n $p<0,0001$ vs SOP; o $p<0,0001$ vs SOG; p $p<0,05$ vs HC; q $p<0,01$ vs HC; r $p<0,01$ vs HF (d, e, f, m, n, p, q, r realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey; a, b, c, g, h, i, j, o usado teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn).

No caso dos valores de colesterol total, foi possível perceber que a dieta rica em carboidratos e a rica em lipídeos elevaram este parâmetro em 56 e 41%, respectivamente, em relação ao grupo S ($p<0,0001$). Dentre as suplementações, o grupo HFOP aumentou a colesterolemia em 39% em relação ao SOP ($p<0,05$) e o grupo SOG foi 48% maior que o grupo S ($p<0,001$). O OP e OG não permitiram a elevaram da colesterolemia nos grupos com ração HC (HCOP e HCOG) em relação a SOP e SOG. Não foram encontradas outras diferenças significativas.

Entre as frações de colesterol, temos que a LDL - colesterol foi elevado no grupo SOG em 79% comparando-se ao grupo S e os grupos que o tem como controle tiveram este parâmetro reduzido. Os grupos HCOG e HFOG foram 52 ($p<0,001$) e 26% ($p<0,05$) menores, respectivamente, em relação ao SOG.

Já em relação à fração HDL - colesterol, as dietas modificadas apresentaram valores maiores que os grupos com dieta padrão. Os grupos HC e HF aumentaram a fração HDL em 90 e 93% em relação ao grupo S, respectivamente ($p<0,0001$). Nos grupos suplementados temos que o HCOP e HFOP elevaram este parâmetro em 74 ($p<0,0001$) e 63% ($p<0,001$) em comparação ao grupo SOP, respectivamente, e os grupos HCOG e HFOG apresentaram aumentos de 124 e 140% em relação ao SOG, respectivamente ($p<0,0001$). Dentre alterações encontradas pela suplementação verificamos que os grupos HCOP e HCOG elevaram o HDL em 31 ($p<0,05$) e 39% ($p<0,01$), respectivamente, em relação ao seu controle sem suplementação (HC). Já em relação aos grupos com dieta hiperlipídica, o OG foi 57% maior que seu controle HF ($p<0,01$).

5.2.5 *Clearance* de creatinina, concentrações plasmáticas de proteína, uréia e creatinina e excreção urinária de proteínas totais

O *clearance* de creatinina apresentou redução de aproximadamente 50% no grupo que recebeu ração rica em carboidrato ($0,6166\pm0,08396\text{mL/min/kg}$) em relação à ração *standard* ($1,286\pm0,2285\text{mL/min/kg}$) ($p<0,05$). O consumo de ração rica em

lipídeos reduziu este parâmetro, mas sem atingir significância estatística (HF, $0,8137 \pm 0,09735 \text{ mL/min/kg}$). A suplementação com óleo de peixe no grupo que recebeu dieta hiperlipídica (HFOP, $0,5867 \pm 0,07040 \text{ mL/min/kg}$) reduziu em 40% o *clearance* de creatinina em relação ao grupo SOP ($0,9815 \pm 0,1475 \text{ mL/min/kg}$) ($p < 0,05$). A suplementação com óleo de girassol nas diferentes dietas e os outros grupos não apresentaram alterações neste parâmetro (SOG, $1,080 \pm 0,2047 \text{ mL/min/kg}$; HCOP, $0,7065 \pm 0,08229 \text{ mL/min/kg}$; HCOG, $0,7810 \pm 0,1028 \text{ mL/min/kg}$; HFOG, $1,142 \pm 0,1527 \text{ mL/min/kg}$), como demonstrado pela FIGURA 10.

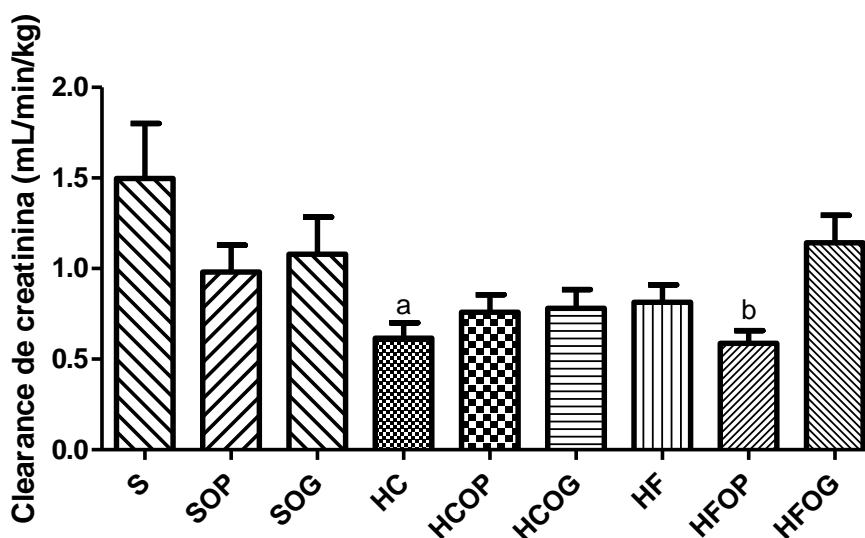


FIGURA 10 *Clearance* de creatinina (mL/min/kg p.c.) dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=20), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=19) ou óleo de girassol (SOG) (n=10), e com ração rica em carboidrato (HC) (n=26) ou em lipídeos (HF) (n=31) e com as mesmas suplementações [HCOP (n=28), HCOG (n=22) e HFOP (n=28), HFOG (n=20)]. Dados expressos em média \pm EPM. a $p < 0,05$ vs S; b $p < 0,05$ vs SOP (a análise feita por teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn; b realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey).

As concentrações plasmáticas de proteínas totais, de uréia e de creatinina e a excreção de proteínas totais pela urina estão apresentadas na TABELA 9. Tanto a proteinemia, quanto a concentração plasmática de creatinina não sofreram modificações pelas dietas ou suplementações. A dieta rica em carboidrato reduziu em 30% a concentração de uréia plasmática em relação ao grupo com dieta padrão ($p < 0,0001$). Esta redução também aparece nos grupos suplementados e que

consumiram dieta rica em carboidrato, sendo que as suplementações com óleo de peixe e óleo de girassol reduziram aproximadamente em 33 e 41%, respectivamente, este parâmetro em relação aos seus grupos controles com dieta padrão (HCOP vs SOP, $p<0,01$; e HCOG vs SOG, $p<0,0001$).

TABELA 9 Proteinemia (g/dL), concentração de uréia (mg/dL) e creatinina plasmática (mg/dL) e excreção urinária de proteínas totais normalizada pela concentração urinária de creatinina (mg/mg) após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG), e com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com as mesmas suplementações (HCOP, HCOG e HFOP, HFOG).

Grupos	Proteinemia (g/dL)	Uréia plasmática (mg/dL)	Creatinina plasmática (mg/dL)	Excreção urinária de proteínas totais/creatinina urinária (mg/mg)
S	4,554±0,1651 (n=13)	52,15±3,512 (n=21)	1,623±0,1477 (n=22)	11,39±0,7840 (n=18)
SOP	4,378±0,1526 (n=9)	45,75±2,276 (n=19)	1,444±0,1217 (n=18)	11,21±1,007 (n=15)
SOG	4,220±0,1348 (n=10)	62,45±3,395 (n=8)	1,478±0,1273 (n=10)	11,05±1,269 (n=10)
HC	4,132±0,1000 (n=19)	35,99±1,676 ^a (n=21)	1,271±0,06887 (n=26)	16,60±1,335 ^f (n=22)
HCOP	4,224±0,1104 (n=21)	35,48±1,659 ^b (n=23)	1,394±0,08543 (n=30)	13,02±1,368 (n=30)
HCOG	4,222±0,1096 (n=23)	36,76±1,906 ^e (n=8)	1,193±0,09373 (n=22)	11,88±1,572 (n=23)
HF	4,458±0,1255 (n=26)	29,59±1,062 ^a (n=27)	1,197±0,1118 (n=34)	12,46±1,181 ^g (n=33)
HFOP	4,522±0,1074 (n=23)	30,18±1,124 ^{cd} (n=26)	1,263±0,1063 (n=30)	10,12±0,7944 (n=29)
HFOG	4,282±0,1267 (n=22)	32,49±2,635 ^e (n=10)	1,519±0,1415 (n=22)	8,360±0,6569 (n=20)

Dados expressos em média ± EPM. a $p<0,0001$ vs S; b $p<0,01$ vs SOP; c $p<0,0001$ vs SOP; d $p<0,01$ vs HCOP; e $p<0,0001$ vs SOG; f $p<0,05$ vs S; g $p<0,05$ vs HC (a, e, f, g realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey; b, c, d usado teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn).

O consumo de dieta rica em lipídeos foi capaz de modificar a uréia plasmática no mesmo perfil que a dieta rica em carboidrato. O grupo HF reduziu aproximadamente 45% este parâmetro em relação ao grupo S ($p<0,0001$), sendo acompanhado por reduções de 35% e 15% do grupo com ração hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe em relação aos grupos SOP ($p<0,0001$) e HCOP ($p<0,01$), respectivamente. A suplementação com óleo de girassol no grupo com ração hiperlipídica reduziu em 48%

a concentração de uréia plasmática em relação ao seu controle com ração padrão (SOG) ($p < 0,0001$).

A excreção urinária de proteínas totais foi normalizada pela concentração urinária de creatinina visto que a coleta de urina pela gaiola metabólica sofre algumas perdas e o fluxo urinário pode ser parcialmente comprometido. Neste parâmetro, o grupo que recebeu dieta rica em carboidrato apresentou aumento significativo de 45% em comparação ao grupo S ($p < 0,05$). O grupo que recebeu dieta rica em lipídeos foi 25% menor que o grupo HC ($p < 0,05$) e não diferente do S. Os grupos que foram suplementados não alteraram a excreção urinária de proteínas totais, mas não permitiram o aumento gerado pela dieta rica em carboidrato.

5.2.6 Eletrólitos e osmolalidade

A partir das dosagens plasmáticas e urinárias de Na^+ e K^+ e do fluxo urinário foi possível calcular a carga excretada destes eletrólitos e a fração de excreção de Na^+ (FE_{Na^+}) que estão mostradas na TABELA 10, juntamente com as concentrações plasmáticas destes íons.

A concentração plasmática de Na^+ não sofreu modificações nos grupos experimentais estudados. Já a concentração sérica de K^+ reduziu-se em aproximadamente 15% nos grupos SOP e SOG em relação ao grupo padrão sem suplementação (S) ($p < 0,05$). Dentre os grupos com dieta hiperlipídica, o grupo HFOG apresentou redução neste parâmetro em 24% em comparação ao grupo HF ($p < 0,01$). Outras diferenças não foram encontradas.

A carga excretada de Na^+ sofreu modificações significativas entre as dietas somente nos grupos suplementados com óleo de girassol. Os grupos HCOG e HFOG reduziram em 82 e 71%, respectivamente, a carga excretada de Na^+ em relação ao grupo SOG ($p < 0,0001$). As outras intervenções não alteraram este parâmetro. Já a carga excretada de K^+ foi modificada entre outros grupos estudados, mas somente pela ação das dietas modificadas. As dietas ricas em carboidratos e em lipídeos diminuíram

em aproximadamente 77% a carga excretada de K^+ em relação ao grupo com dieta *standard* ($p<0,01$). Já entre os grupos suplementados, temos que o grupo HFOP reduziu em 60% este parâmetro em comparação ao grupo SOP e os grupos HCOG e HFOG foram 85 ($p<0,01$) e 77% ($p<0,05$) menores, respectivamente, comparando-se ao grupo SOG.

TABELA 10 Concentrações plasmáticas (mEq/dL) e carga excretada (μ Eq/min) de Na^+ e K^+ e fração de excreção (FE) (%) de Na^+ após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG), e com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com as mesmas suplementações (HCOP, HCOG e HFOP, HFOG).

Grupos	[Na^+] plasmática (mEq/dL)	[K^+] plasmática (mEq/dL)	Carga excretada de Na^+ (μ Eq/min)	Carga excretada de K^+ (μ Eq/min)	FE $_{Na^+}$ (%)
S	155,6 \pm 2,418 (n=9)	6,738 \pm 0,1929 (n=8)	0,2465 \pm 0,0587 (n=14)	0,5459 \pm 0,1339 (n=8)	3,111 \pm 0,5666 (n=14)
SOP	149,6 \pm 2,928 (n=10)	5,872 \pm 0,2205 ^a (n=9)	0,1854 \pm 0,0303 (n=15)	0,3201 \pm 0,06248 (n=8)	3,676 \pm 0,5744 (n=15)
SOG	145,2 \pm 4,310 (n=6)	5,758 \pm 0,3562 ^a (n=6)	0,2681 \pm 0,0124 (n=5)	0,4483 \pm 0,0826 (n=6)	3,745 \pm 1,323 (n=6)
HC	153,3 \pm 5,342 (n=9)	6,238 \pm 0,2915 (n=8)	0,0899 \pm 0,0114 (n=13)	0,1273 \pm 0,0332 ^d (n=9)	2,692 \pm 0,2175 (n=13)
HCOP	150,6 \pm 2,592 (n=12)	6,238 \pm 0,2613 (n=12)	0,1339 \pm 0,0182 (n=16)	0,1609 \pm 0,0216 (n=12)	3,477 \pm 0,6829 (n=17)
HCOG	161,7 \pm 4,569 (n=7)	5,900 \pm 0,3873 (n=6)	0,0492 \pm 0,0080 ^c (n=6)	0,0694 \pm 0,0210 ^f (n=7)	1,801 \pm 0,2455 (n=7)
HF	157,0 \pm 2,984 (n=11)	6,614 \pm 0,2295 (n=11)	0,08749 \pm 0,0118 (n=13)	0,1221 \pm 0,0197 ^d (n=8)	1,403 \pm 0,1631 ^d (n=12)
HFOP	152,6 \pm 2,513 (n=10)	5,894 \pm 0,2450 (n=9)	0,1073 \pm 0,0182 (n=12)	0,1344 \pm 0,0285 ^e (n=10)	2,439 \pm 0,3745 (n=12)
HFOG	147,1 \pm 5,280 (n=6)	5,050 \pm 0,3235 ^b (n=6)	0,0780 \pm 0,0170 ^c (n=6)	0,1042 \pm 0,0225 ^g (n=6)	1,395 \pm 0,5015 (n=6)

Dados expressos em média \pm EPM. a $p<0,05$ vs S; b $p<0,01$ vs HF; c $p<0,0001$ vs SOG; d $p<0,01$ vs S; e $p<0,05$ vs SOP; f $p<0,01$ vs SOG; g $p<0,05$ vs SOG; (a, b, c, d realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey; e, f, g usado teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn).

Em relação à fração de excreção de Na^+ , somente a dieta hiperlipídica apresentou alguma alteração. O grupo HF foi 55% menor neste parâmetro que o grupo S ($p<0,01$). A dieta rica em carboidrato e as suplementações não modificaram significativamente a FE $_{Na^+}$.

Em relação ao transporte tubular renal de sódio, foram realizadas análises sobre o *clearance* de lítio, representando a reabsorção proximal tubular de sódio, e a

excreção pós-proximal fracional de Na^+ , que representa a fração da carga filtrada de Na^+ que é excretada pelos segmentos distais do néfron e permite estimar a reabsorção deste nesta região. Os valores destas duas variáveis estão demonstrados na TABELA 11. Entre as dietas modificadas, o grupo HC e o HF apresentaram reduções de 37 e 50%, respectivamente, nos valores de clearance de lítio em relação ao grupo S, mas sem diferença estatisticamente significativa. Sobre este mesmo parâmetro, não houve alterações geradas pela suplementação com óleo de peixe.

TABELA 11 Clearance de lítio (C_{Li}) e a Excreção Pós-Proximal Fracional de Na^+ ($\text{EPPF}_{\text{Na}^+}$) (%) após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP), e com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com a mesma suplementação (HCOP e HFOP).

Grupos	Clearance de Lítio (mL/min)	Excreção pós-proximal fracional de Na^+ (%)
S	0,1833±0,04411 (n=10)	2,058±0,9484 (n=10)
SOP	0,1630±0,04137 (n=9)	0,5786±0,1416 (n=7)
HC	0,1165±0,2838 (n=9)	0,4945±0,09574 (n=8)
HCOP	0,1680±0,04063 (n=10)	0,5104±0,06520 (n=8)
HF	0,09342±0,03131 (n=9)	0,6817±0,2146 (n=7)
HFOP	0,1351±0,02907 (n=7)	0,6007±0,1890 (n=6)

Dados expressos em média ± EPM.

Em relação aos valores da razão *clearance* de sódio pelo *clearance* de lítio, ou excreção pós-proximal fracional de sódio, estes não sofreram modificações significativas entre os grupos em estudo, tanto pelas dietas modificadas, quanto pela suplementação com óleo de peixe.

As osmolalidades plasmática e urinária foram dosadas e estão mostradas na TABELA 12, juntamente com os valores de *clearance* água livre calculados a partir da osmolalidade plasmática e urinária e do fluxo urinário de cada animal. A dieta HC apresentou valores 10% menores na osmolalidade plasmática e 50% menores na osmolalidade urinária comparado ao grupo S ($p<0,05$). Já a dieta HF reduziu a osmolalidade urinária em 40% em relação ao mesmo grupo ($p<0,05$). Entre os grupos suplementados temos que o grupo HCOP reduziu a osmolalidade plasmática e urinária em 5 ($p<0,05$) e 59% ($p<0,01$), respectivamente, em relação ao grupo SOP. E o grupo HFOP aumentou a osmolalidade urinária em aproximadamente 2 vezes em relação ao

grupo HCOP ($p<0,01$). Não houve diferenças entre os grupos suplementados com óleo de girassol.

TABELA 12 Osmolalidade plasmática (mOsm/kg H₂O), osmolalidade urinária (mOsm/kg H₂O), *clearance* de H₂O livre (mL/min) e fluxo urinário (mL/min) após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ou óleo de girassol (SOG), e com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com as mesmas suplementações (HCOP, HCOG e HFOP, HFOG).

Grupos	Osmolalidade plasmática (mOsm/kg H ₂ O)	Osmolalidade urinária (mOsm/kg H ₂ O)	<i>Clearance</i> de H ₂ O livre (mL/min)	Fluxo Urinário (mL/min)
S	301,7±2,041 (n=9)	875,3±121,6 (n=8)	-0,00967±0,0029 (n=8)	4,4533±1,114 (n=9)
SOP	299,0±3,273 (n=8)	878,3±111,7 (n=8)	-0,00585±0,0016 (n=8)	2,975±0,5063 (n=8)
SOG	311,6±2,182 (n=5)	651,0±115,1 (n=6)	-0,00337±0,0013 (n=5)	4,233±0,5475 (n=6)
HC	274,7±6,799 ^a (n=9)	435,1±45,17 ^c (n=8)	-0,00098±0,0005 ^a (n=6)	1,552±0,1213 ^g (n=9)
HCOP	284,1±5,370 ^b (n=8)	359,7±40,43 ^d (n=7)	-0,00041±0,0003 ^f (n=8)	2,351±0,6624 (n=8)
HCOG	291,6±10,06 (n=7)	452,7±103,5 (n=7)	0,00012±0,0013 (n=7)	2,856±0,9238 (n=7)
HF	286,9±7,795 (n=9)	531,2±101,4 ^c (n=9)	-0,00061±0,0011 ^a (n=9)	1,226±0,1776 ^h (n=8)
HFOP	293,3±3,374 (n=8)	853,6±111,2 ^e (n=7)	-0,00200±0,0004 ^d (n=7)	1,176±0,1428 ^b (n=8)
HFOG	306,7±6,800 (n=6)	332,7±96,58 (n=6)	0,00061±0,0013 (n=6)	5,5750±1,154 ⁱ (n=6)

Dados expressos em média ± EPM. a $p<0,05$ vs S; b $p<0,05$ vs SOP; c $p<0,05$ vs S; d $p<0,01$ vs SOP; e $p<0,01$ vs HCOP; f $p<0,001$ vs SOP; g $p<0,01$ vs S; h $p<0,001$ vs S; i $p<0,0001$ vs HF (b, c, d, e, f, g, h, i realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey; a usado teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn).

Em relação ao *clearance* de água livre, temos que as dietas modificadas HC e HF aumentaram em 90 e 94%, respectivamente, os valores em relação ao grupo S ($p<0,05$). Isto indica que a reabsorção de água pelo ducto coletor está diminuída nestes animais. Entre os grupos suplementados, os grupos HCOP e HFOP elevaram em 93% ($p<0,001$) e 66% ($p<0,01$), respectivamente, este mesmo parâmetro em comparação ao grupo SOP. Não houve diferenças entre os grupos suplementados com óleo de girassol.

Os valores de fluxo urinário estão demonstrados na TABELA 12, juntamente com os valores de osmolalidade. Dentre as diferenças encontradas neste parâmetro, temos que as dietas modificadas, HC e HF, apresentaram reduções de 66 ($p<0,01$) e 73% ($p<0,001$), respectivamente, em comparação com o grupo S. Em relação aos grupos que receberam as suplementações com óleo de peixe e óleo de girassol, houve reduções no fluxo urinário nos grupos HFOP em 60% comparando-se com o grupo SOP ($p<0,0001$), já a suplementação com OG foi capaz de elevar o fluxo urinário em 4,7

vezes no grupo HFOG em relação ao seu controle HF.

A suplementação com óleo de girassol, rico em ácidos graxos n-6, foi adicionado ao trabalho visto o papel proposto aos integrantes da família de ácidos graxos n-6 sobre a função renal, especialmente na hemodinâmica renal. A principal metodologia utilizada na avaliação da função renal é a filtração glomerular e a suplementação com óleo de girassol não modificou este parâmetro. Além disso, as alterações metabólicas encontradas nos grupos com suplementação com óleo de girassol se devem mais pela dieta recebida do que somente pela suplementação AGPI n-6.

Sendo assim e adicionado o fato que com os grupos com dieta padrão introduzidos no modelo experimental temos nove grupos experimentais e a utilização de algumas metodologias ficaria inviável para todos estes grupos ou com número de animais muito pequeno em cada análise, os grupos com suplementação com óleo de girassol foram excluídos para as metodologias de ELISA e de imunomarcação do tecido renal, entre outras dosagens, ficando, portanto, somente a suplementação com óleo de peixe nas três diferentes dietas, nos resultados apresentados a seguir.

5.2.7 Excreção urinária de prostaglandina E₂ e tromboxano B₂

Foram realizadas dosagens da excreção urinária de prostaglandina E₂ e tromboxano B₂ como mostrado pela FIGURA 11A e 11B, respectivamente. As modificações na ração (S, 5,991±1,151pg/min; HC, 3,183±0,4357pg/min; HF, 5,114±1,243pg/min) ou a suplementação com óleo de peixe (SOP, 5,446±1,158pg/min; HCOP, 3,150±0,7107pg/min; HFOP, 4,261±0,6019pg/min) não foram capazes de alterar significativamente a excreção urinária de PGE₂. No caso da excreção de TXB₂, é possível notar que as modificações encontradas para este parâmetro diz respeito ao consumo das dietas modificadas e não da suplementação com óleo de peixe. As dietas ricas em carboidratos (1,831±0,4136pg/min) e em lipídeos (2,233±0,4243pg/min) reduziram em aproximadamente 65 e 57%, respectivamente, a excreção urinária de TXB₂ comparadas ao grupo com dieta padrão (5,192±0,8088pg/min) (HC vs S, p<0,001;

HF vs S, $p < 0,01$). Já entre as suplementações, tivemos o mesmo padrão acima, onde houve redução de 50 e 46% entre HCOP ($2,196 \pm 0,3078 \text{ pg/min}$) e HFOP ($2,362 \pm 0,4602 \text{ pg/min}$) em relação ao grupo SOP ($4,341 \pm 0,6789 \text{ pg/min}$) ($p < 0,05$), respectivamente.

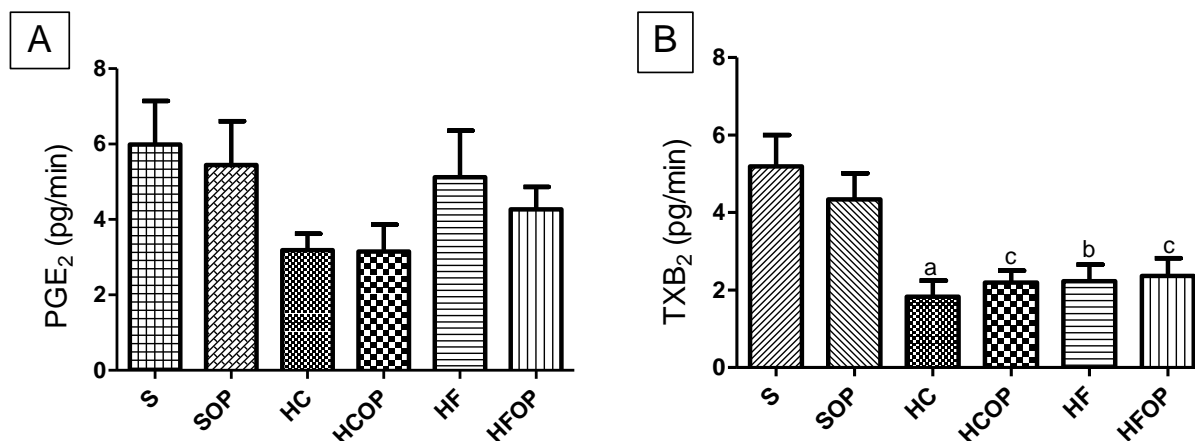


FIGURA 11 Excreção urinária de prostaglandina (PG) E₂ (A) e de tromboxano (TX) B₂ dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=10), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=11), com ração rica em carboidrato (HC) (n=12) ou em lipídeos (HF) (n=10) e com as suplementações [HCOP (n=9) e HFOP (n=9)]. Dados expressos em média \pm EPM. a $p < 0,001$ vs S; b $p < 0,01$ vs S; c $p < 0,05$ vs SOP. Realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey.

5.2.8 Concentração plasmática de adiponectina, plasmática e renal de TNF- α e excreção urinária de albumina

As concentrações plasmáticas de TNF- α e de adiponectina foram analisadas e estão representadas na FIGURA 12A e 12B. A concentração plasmática de TNF- α não apresentou modificações entre os grupos que receberam as dietas modificadas (S, $3,609 \pm 1,412 \text{ pg/mL}$, n=8; HC, $3,069 \pm 0,3471 \text{ pg/mL}$, n=8; HF, $2,955 \pm 0,5081 \text{ pg/mL}$, n=8). Já entre os grupos que receberam suplementação, verificou-se que a suplementação com OP no grupo que consumiu dieta rica em lipídeos (HFOP, $1,564 \pm 0,3110 \text{ pg/mL}$, n=8) foi capaz de reduzir a concentração de TNF- α aproximadamente 50% em relação ao grupo com mesma suplementação e dieta padrão (SOP, $3,334 \pm 0,2227 \text{ pg/mL}$, n=5) e em comparação ao seu controle sem suplementação (HF, valor já mencionado). O

grupo HCOP ($2,031 \pm 0,6692 \text{ pg/mL}$, $n=6$) não apresentou modificações significativas neste parâmetro (FIGURA 12A).

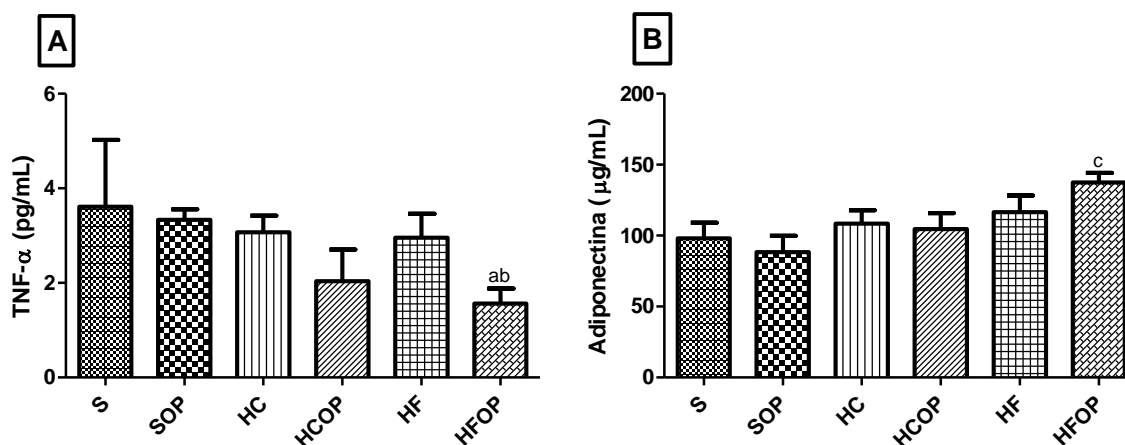


FIGURA 12 Concentração plasmática de TNF- α (pg/mL) (A) e adiponectina (B) dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S), com suplementação com óleo de peixe (SOP), com ração rica em carboidrato (HC) ou em lipídeos (HF) e com as suplementações (HCOP e HFOP). Dados expressos em média \pm EPM. a $p < 0,05$ vs SOP; b $p < 0,05$ vs HF; c $p < 0,01$ vs SOP (a, b, c realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey).

A concentração sérica de adiponectina sofreu o mesmo padrão de modificação dos valores de TNF- α plasmáticos, com as dietas modificadas (HC, $108,5 \pm 9,249 \mu\text{g/mL}$, $n=9$; HF, $116,3 \pm 11,89 \mu\text{g/mL}$, $n=9$) não sendo significativamente diferentes do grupo padrão (S, $97,87 \pm 11,17 \mu\text{g/mL}$, $n=10$), entretanto o grupo HFOP ($116,3 \pm 11,89 \mu\text{g/mL}$, $n=9$), diferente do que ocorreu na dosagem de TNF- α , aumentou em 55% a adiponectina plasmática em relação ao grupo SOP ($88,35 \pm 11,60 \mu\text{g/mL}$, $n=9$). O grupo HCOP ($104,60 \pm 11,23 \mu\text{g/mL}$, $n=9$) não modificou este parâmetro (FIGURA 12B).

A concentração de TNF- α no tecido renal foi analisada normalizando-se os valores pela concentração de proteína no homogenato renal. Os valores apresentaram modificações em relação aos grupos experimentais estudados, com variações entre as rações usadas e pela suplementação com óleo de peixe. Como mostrado na FIGURA 13, a dieta hiperlipídica ($862,6 \pm 80,74 \text{ pg/g}$ de proteína) apresentou maior concentração desta citocina em relação ao grupo S ($437,0 \pm 23,85 \text{ pg/g}$ de proteína) e ao grupo HC

($529,9 \pm 16,99$ pg/g de proteína) em 97 e 63%, respectivamente ($p < 0,0001$). Houve diferenças entre as dietas nos grupos que receberam óleo de peixe, onde o grupo HCOP ($629,2 \pm 48,02$ pg/g de proteína) aumentou em 35% em relação ao grupo SOP ($464,7 \pm 17,43$ pg/g de proteína) ($p < 0,001$) e o grupo HFOP ($334,7 \pm 18,36$ pg/g de proteína) reduziu este parâmetro em 28% em relação ao SOP ($p < 0,01$) e em 47% em relação ao HCOP ($p < 0,0001$). Neste último caso percebe-se que a redução da concentração de $\text{TNF-}\alpha$ no tecido renal pelo grupo HFOP não se deve à dieta hiperlipídica, já que esta sozinha aumentou este parâmetro em relação aos seus grupos controles e, sim, ao papel do óleo de peixe, apresentando redução de 60% em relação ao grupo HF ($p < 0,0001$).

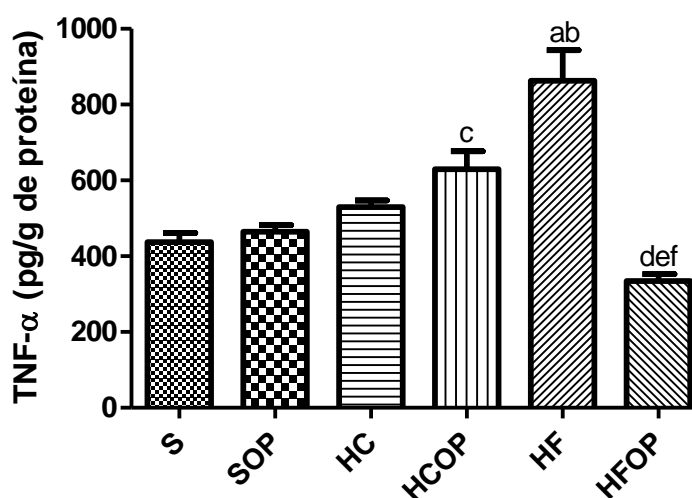


FIGURA 13 Concentração de $\text{TNF-}\alpha$ no tecido renal normalizado pela concentração de proteína (pg/g de proteína) dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) ($n=13$), com suplementação com óleo de peixe (SOP) ($n=13$), com ração rica em carboidrato (HC) ($n=13$) ou em lipídeos (HF) ($n=13$) e com as suplementações [HCOP ($n=12$) e HFOP ($n=13$)]. Dados expressos em média \pm EPM. a $p < 0,0001$ vs S; b $p < 0,0001$ vs HC; c $p < 0,001$ vs SOP; d $p < 0,01$ vs SOP; e $p < 0,0001$ vs HCOP; f $p < 0,0001$ vs HF (a, b, c, d, e realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey; f realizado teste t não pareado).

A excreção urinária de albumina foi normalizada pela concentração urinária de creatinina e está representada na FIGURA 14. O consumo de dieta hiperlipídica ($35,65 \pm 7,327$ ng/mg) foi capaz de aumentar mais de 3x a excreção urinária de albumina em relação ao grupo com dieta padrão ($11,06 \pm 2,164$ ng/mg) ($p < 0,01$). O consumo de

dieta rica em carboidrato não modificou este parâmetro ($18,24 \pm 2,746 \text{ ng/mg}$). A suplementação com óleo de peixe não alterou a excreção de albumina nas dietas analisadas (SOP, $12,38 \pm 3,341 \text{ ng/mg}$; HCOP, $16,04 \pm 5,155 \text{ ng/mg}$), mesmo o grupo HFOP ($21,33 \pm 1,930 \text{ ng/mg}$) reduzindo 40% esta excreção em relação ao grupo HF, não apresentou diferença significativa ($p=0,08$).

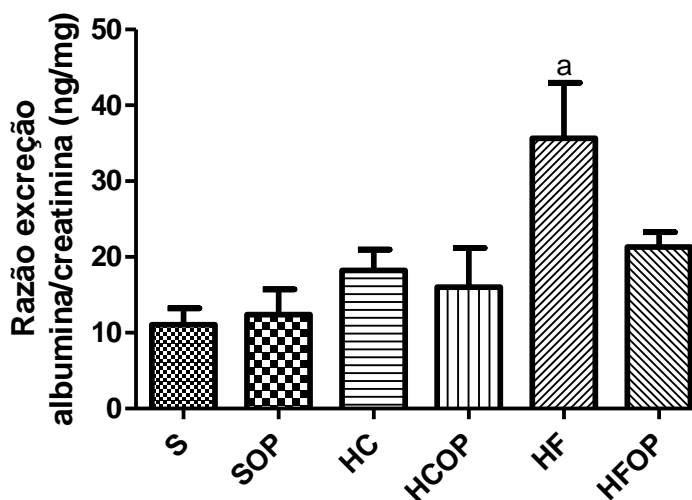


FIGURA 14 Razão da excreção urinária de albumina normalizado pela concentração urinária de creatinina (ng/mg) dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=6), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=6), com ração rica em carboidrato (HC) (n=6) ou em lipídeos (HF) (n=7) e com as suplementações [HCOP (n=6) e HFOP (n=7)]. Dados expressos em média \pm EPM. a $p < 0,01$ vs S (análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey).

5.2.9 Imunohistoquímica renal

Para identificação de alterações morfológicas no tecido renal foram realizadas análises de imunohistoquímica utilizando marcadores de modificações celulares e protéicas no tecido renal.

A expressão de α -actina de musculatura lisa (α -SMA - *smooth muscle actin*), uma proteína de citoesqueleto, é mais intensa no glomérulo e capilares peritubulares durante o desenvolvimento inicial pós-natal renal e, em condições normais, sua marcação é restrita na parede de arteríolas e de artérias quando a maturação destas

estruturas está completa (BALBI *et al.*, 2008). A marcação desta proteína foi analisada por score de marcação e, como mostrada na FIGURA 15A, não apresentou alterações a respeito do consumo das dietas modificadas sem a suplementação com óleo de peixe por glomérulo (S, $0,2133 \pm 0,0478$; HC, $0,3817 \pm 0,0729$; HF, $0,3133 \pm 0,0217$). Quando analisamos os grupos suplementados, é possível perceber que a dieta rica em carboidrato apresentou aumento de mais de 3 vezes na marcação desta proteína nos glomérulos em relação ao grupo SOP ($0,1200 \pm 0,0200$) ($p < 0,0001$) e já o grupo HFOP ($0,2267 \pm 0,0341$) reduziu este parâmetro em aproximadamente 50% em relação ao grupo HCOP ($0,4133 \pm 0,0478$) ($p < 0,001$).

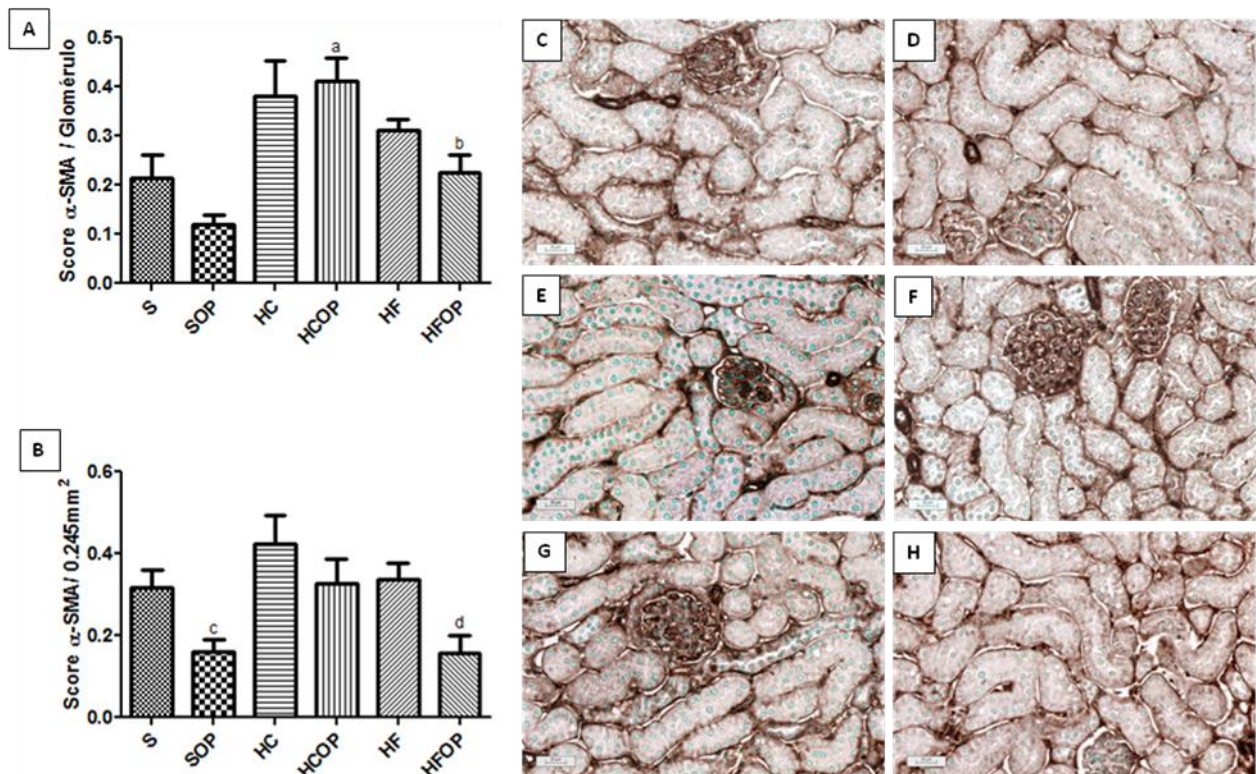


FIGURA 15 Imunolocalização para α -SMA (*smooth muscle actin*) analisado por score por glomérulo (A) e por campo tubulointersticial ($0,245\text{mm}^2$) (B). Imagens representativas dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=6) (C), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=6) (D), com ração rica em carboidrato (HC) (n=6) (E), com suplementação com óleo de peixe (HCOP) (n=6) (F) e com ração rica em lipídeos (HF) (n=6) (G), com a suplementação (HFOP) (n=6) (H). Dados expressos em média \pm EPM. a $p < 0,0001$ vs SOP; b $p < 0,001$ vs HCOP; c $p < 0,05$ vs S; d $p < 0,05$ vs HF (a, b realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey; c, d realizado teste t não pareado).

A suplementação com OP foi capaz de reduzir pela metade o *score* de marcação tubulointersticial de α -SMA em relação ao grupo S e ao grupo HF [SOP vs S, $p < 0,05$ ($0,1583 \pm 0,0310$ vs $0,3167 \pm 0,0424$; HFOP vs HF, $p < 0,05$ ($0,1550 \pm 0,0452$ vs $0,3367 \pm 0,0395$)], verificando o papel exclusivo do óleo de peixe nestes dois casos. Os grupos que consumiram dieta rica em carboidrato sem (HC, $0,4250 \pm 0,06898$) ou com a suplementação com OP (HCOP, $0,3267 \pm 0,0602$) não apresentaram modificações neste caso (FIGURA 15B). Nas FIGURAS 15C, D, E, F, G, H estão demonstradas imagens representativas da marcação para α -SMA nos grupos experimentais.

A marcação para vimentina representa a expressão de uma proteína de citoesqueleto por células, que em condições normais, não a expressam. No caso da vimentina sua expressão seria relacionada com dano nas células tubulares e intersticiais (COIMBRA *et al.*, 2000). Como representado pela FIGURA 16, as células positivas para vimentina foram analisadas por campo intersticial (FIGURA 16A) e por campo de células tubulares (FIGURA 16B). Os grupos com rações modificadas HC ($15,20 \pm 0,5381$) e HF ($13,05 \pm 1,015$) geraram aumento da marcação para vimentina nas células intersticiais de aproximadamente 60 e 40% em relação ao grupo com ração padrão ($9,536 \pm 0,9173$), respectivamente (HC vs S, $p < 0,001$; HF vs S, $p < 0,05$). Em relação ao grupo com suplementação, HCOP ($15,51 \pm 1,090$) aumentou em 40% este parâmetro em relação ao grupo SOP ($10,90 \pm 0,6641$) ($p < 0,01$). O OP não modificou de forma significativa este parâmetro no grupo com dieta HF (HFOP, $12,61 \pm 0,8754$).

Ao analisarmos a marcação para vimentina nas células tubulares é possível notar que a dieta HF ($5,933 \pm 0,6866$) aumenta em 80% a marcação destas em comparação ao grupo S ($3,314 \pm 0,2932$) (HF vs S, $p < 0,05$) e o óleo de peixe é capaz de reverter este quadro, reduzindo em mais da metade a quantidade de células positivas para vimentina em relação ao seu controle sem suplementação (HFOP, $2,691 \pm 0,7130$) (HFOP vs HF, $p < 0,01$) (FIGURA 16B). Não houve outras modificações significativas neste parâmetro (SOP, $2,533 \pm 0,4352$; HC, $4,226 \pm 0,8165$; HCOP, $4,605 \pm 0,5173$). Nas FIGURAS 16C, D, E, F, G, H aparecem imagens representativas da marcação para vimentina nos grupos experimentais nas células tubulares e intersticiais.

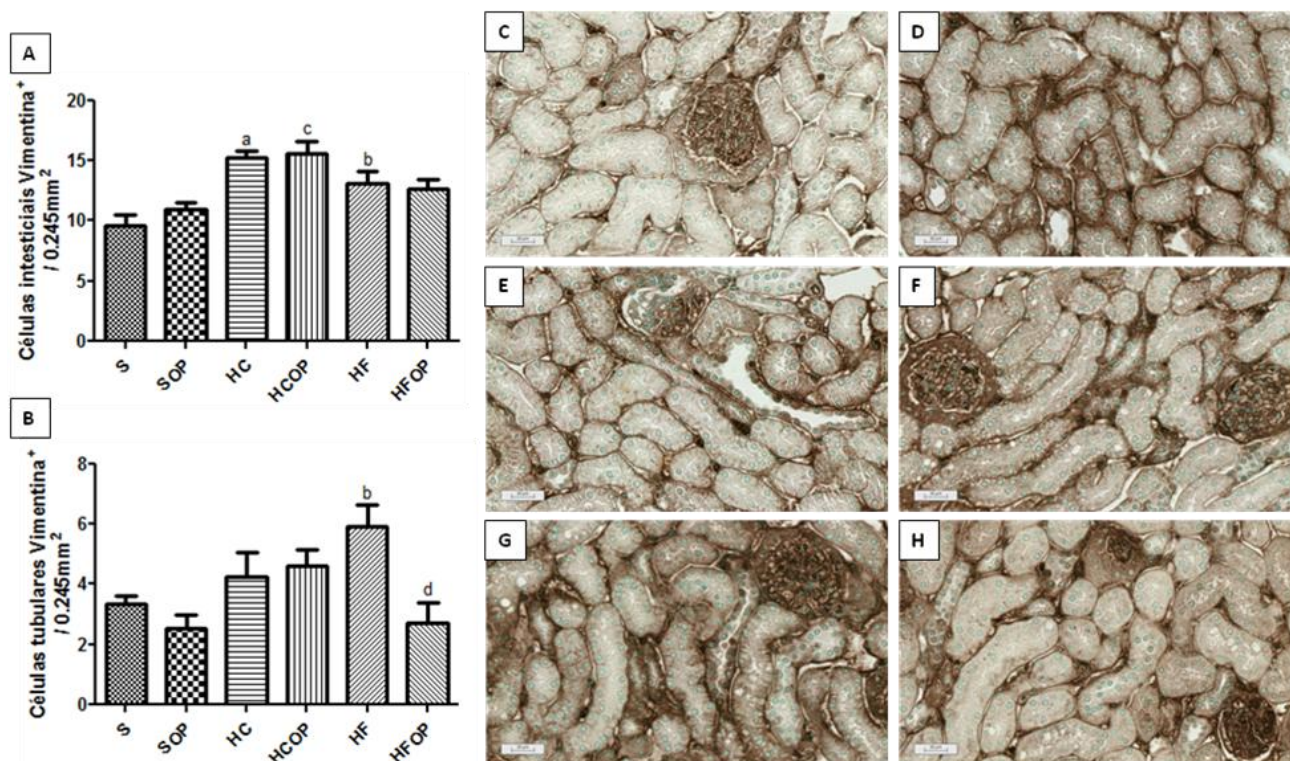


FIGURA 16 Imunolocalização para vimentina analisado por células positivas para vimentina por campo intersticial (0,245mm²) (A) e por campo tubular (0,245mm²) (B). Imagens representativas dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=8) (C), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=8) (D), com ração rica em carboidrato (HC) (n=7) (E), com suplementação com óleo de peixe (HCOP) (n=8) (F) e com ração rica em lipídeos (HF) (n=8) (G), com a suplementação (HFOP) (n=8) (H). Dados expressos em média \pm EPM. a $p < 0,001$ vs S; b $p < 0,05$ vs S; c $p < 0,01$ vs SOP; d $p < 0,01$ vs HF (a, b, c realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey; d realizado teste t não pareado).

As células positivas para PCNA representam células em proliferação, representando modificações morfológicas teciduais. No caso da imunolocalização de PCNA nos glomérulos (FIGURA 17A), não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos estudados (S, $0,8717 \pm 0,2325$; SOP, $0,9880 \pm 0,1222$; HC, $1,103 \pm 0,1693$; HCOP, $1,400 \pm 0,0800$; HF, $1,497 \pm 0,2307$; HFOP, $1,263 \pm 0,1350$). No caso das células tubulares e intersticiais (FIGURA 17B) percebem-se diferenças entre as dietas, principalmente da dieta rica em carboidrato (HC, $23,59 \pm 4,326$). Esta aumentou aproximadamente em 3 vezes a quantidade de células marcadas com PCNA em relação ao grupo S ($8,202 \pm 1,345$) (HC vs S, $p < 0,01$) e 1,7 vezes em relação ao grupo SOP ($12,14 \pm 1,510$) (HCOP vs SOP, $p < 0,01$, sendo HCOP, $20,92 \pm 2,214$). Não foram

encontradas diferenças em relação aos grupos com dieta rica em lipídeos (HF, $14,98 \pm 2,527$; HFOP, $16,38 \pm 1,170$). Nas FIGURAS 17C, D, E, F, G, H aparecem imagens representativas da marcação para PCNA nos grupos experimentais.

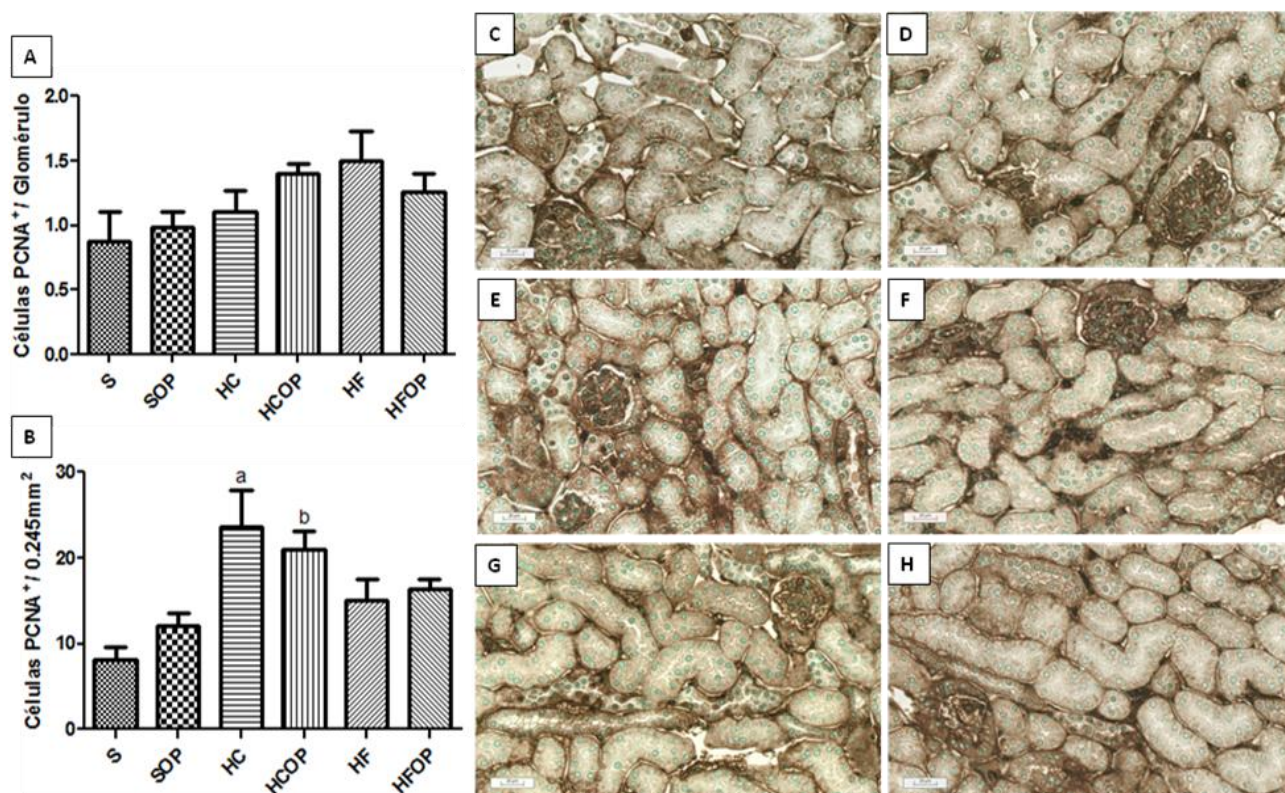


FIGURA 17 Imunolocalização para PCNA (*proliferation cell nuclear antigen*) analisado por células positivas para PCNA por glomérulo (A) e por campo tubulointersticial ($0,245\text{mm}^2$) (B). Imagens representativas dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=6) (C), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=5) (D), com ração rica em carboidrato (HC) (n=6) (E), com suplementação com óleo de peixe (HCOP) (n=5) (F) e com ração rica em lipídeos (HF) (n=6) (G), com a suplementação (HFOP) (n=6) (H). Dados expressos em média \pm EPM. a $p < 0,01$ vs S; b $p < 0,01$ vs SOP (a, b realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey).

Como a marcação para vimentina, a imunolocalização de desmina, uma proteína de citoesqueleto, também representa que as células glomerulares estão expressando proteínas não comumente expressadas, no caso da desmina, maior expressão desta no glomérulo, representa hipertrofia glomerular (COIMBRA *et al.*, 2000). Esta marcação foi avaliada pelo score de marcação para desmina e está representada pela FIGURA 18A. A única diferença significativa encontrada foi um aumento de 50% do score para

desmina no grupo HFOP ($0,4520 \pm 0,0258$) comparado com o SOP ($0,2933 \pm 0,0406$) ($p < 0,01$). Não foram encontradas outras modificações neste parâmetro (S, $0,3200 \pm 0,0615$; HC, $0,3980 \pm 0,05589$; HCOP, $0,3840 \pm 0,01939$; HF, $0,4833 \pm 0,03323$). Nas FIGURAS 18B, C, D, E, F, G estão demonstradas imagens representativas da marcação para desmina nos glomérulos dos grupos experimentais.

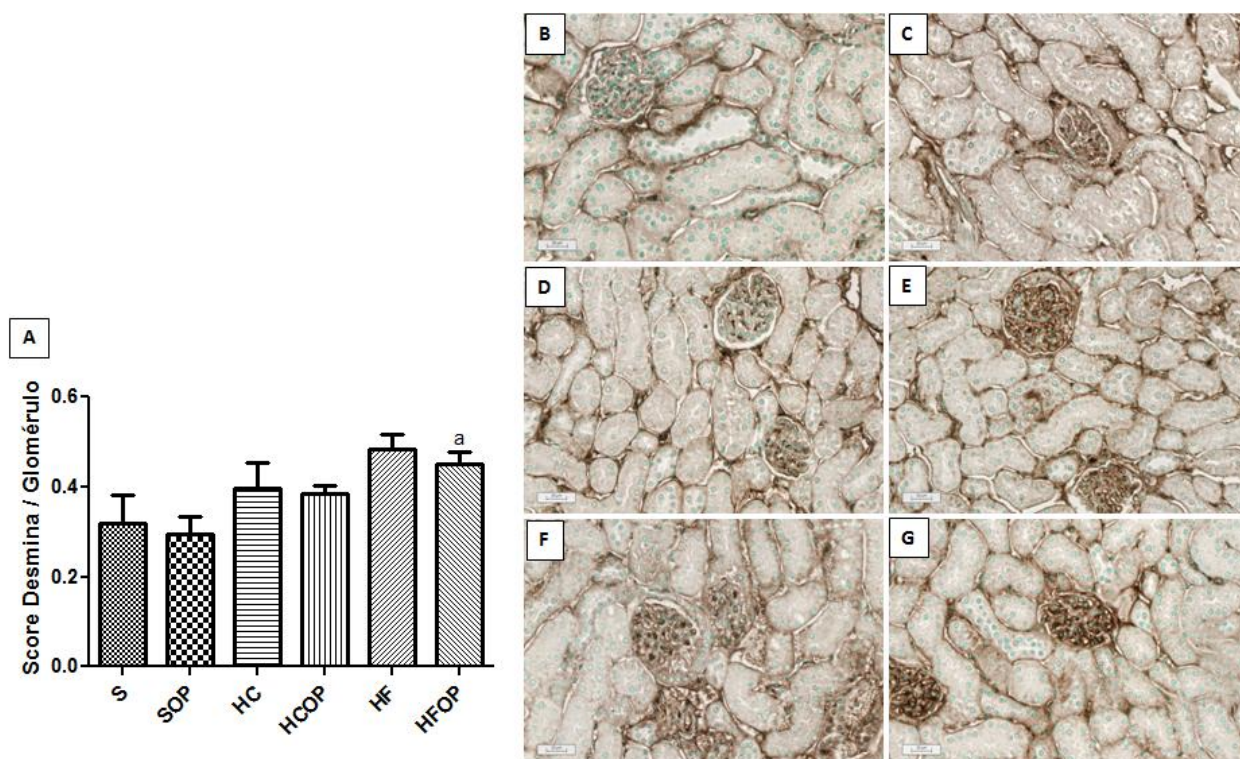


FIGURA 18 Imunolocalização para desmina analisado por score por glomérulo (A). Imagens representativas dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=6) (B), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=6) (C), com ração rica em carboidrato (HC) (n=5) (D), com suplementação com óleo de peixe (HCOP) (n=5) (E) e com ração rica em lipídeos (HF) (n=6) (F), com a suplementação (HFOP) (n=5) (G). Dados expressos em média \pm EPM. a $p < 0,01$ vs SOP (a realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey).

Outra análise realizada em relação à morfologia do tecido foi a imunolocalização de pJNK (c-jun cinase N-terminal). Esta marcação caracteriza-se pela maior expressão de uma das proteínas que medeiam a apoptose e aumentam a expressão de mediadores pró-inflamatórios (FRANCESCATO *et al.*, 2007). Como mostrado na FIGURA 19, as células positivas para pJNK foram separadas por glomérulo (A) e por

campo tubulointersticial (B). Quando analisamos os glomérulos vemos que as diferentes rações não modificaram significativamente a marcação para esta proteína (S, $0,9100 \pm 0,1643$; HC, $1,240 \pm 0,2850$; HF, $1,707 \pm 0,2905$), mas a presença da suplementação com óleo de peixe no grupo com ração hiperlipídica ($0,5480 \pm 0,08261$) reduziu em 70% as células positivas para pJNK em relação ao grupo sem suplementação (HFOP vs HF, $p < 0,01$). Não houve modificações nos outros grupos suplementados (SOP, $0,6067 \pm 0,2020$; HCOP, $1,430 \pm 0,4282$).

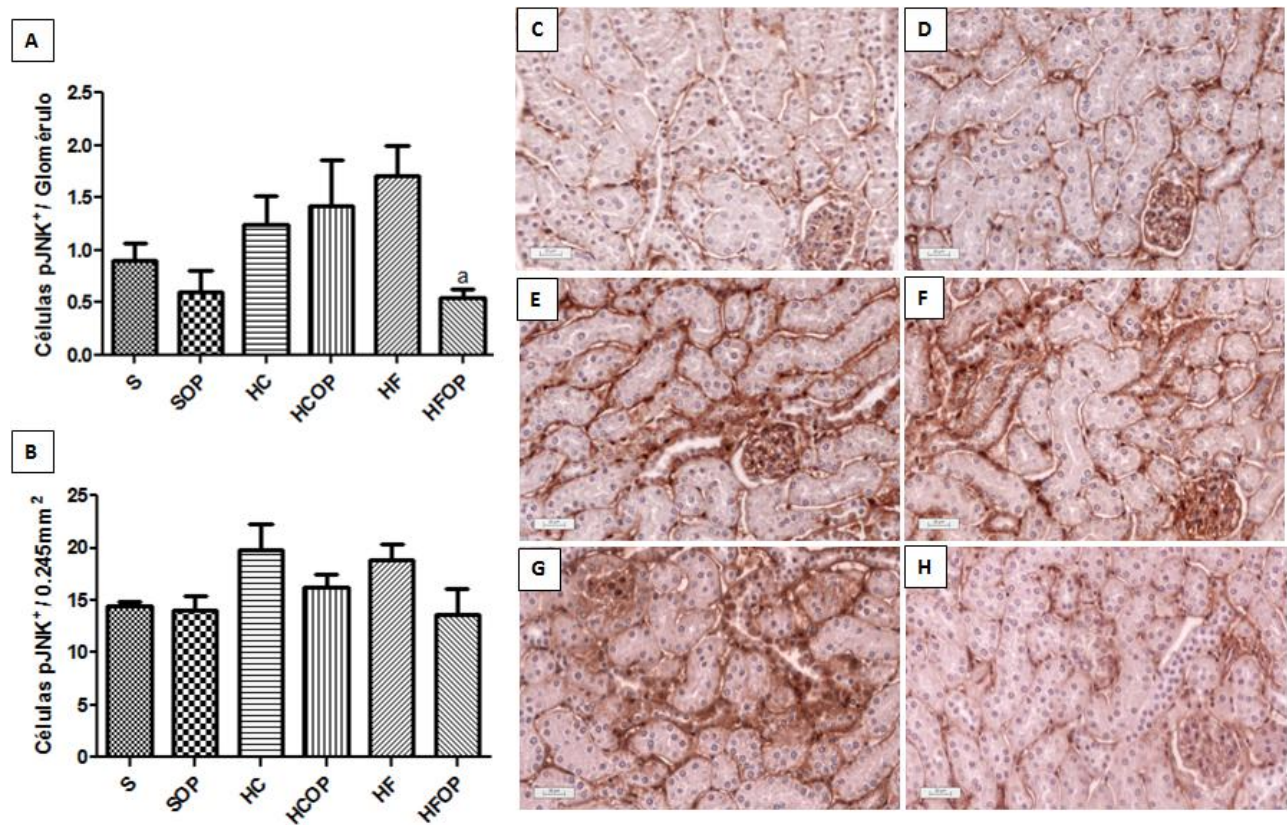


FIGURA 19 Imunolocalização para pJNK (c-jun cinase N-terminal) analisado por células positivas para pJNK por glomérulo (A) e por campo tubulointersticial ($0,245\text{mm}^2$) (B). Imagens representativas dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=6) (C), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=6) (D), com ração rica em carboidrato (HC) (n=6) (E), com suplementação com óleo de peixe (HCOP) (n=6) (F) e com ração rica em lipídeos (HF) (n=6) (G), com a suplementação (HFOP) (n=5) (H). Dados expressos em média \pm EPM. a $p < 0,01$ vs HF (a realizado teste t não pareado).

O número de células positivas para pJNK no espaço tubulointersticial não apresentou alterações nos grupos em estudo (S, $14,41 \pm 0,4907$; SOP, $14,06 \pm 1,291$; HC,

19,78±2,467; HCOP, 16,25±1,289; HF, 18,81±1,504; HFOP, 13,65±2,405). Nas FIGURAS 19C, D, E, F, G, H se encontram imagens representativas da marcação de pJNK nos grupos experimentais.

5.2.10 Expressão protéica de AMPK- α 1, COX-2 e subunidade p65 do NF- κ B

A expressão de algumas proteínas relacionadas com o metabolismo da função renal e com as possíveis alterações geradas pelas dietas foi analisada. A expressão da enzima AMPK- α 1 (adenosina monofosfato cinase) foi normalizada pela expressão de β -actina e apresenta-se em % do grupo S, está demonstrada pela FIGURA 20. Houve redução significativa de 12% na expressão desta enzima no grupo que recebeu dieta rica em carboidrato (88,57±3,130%) em relação ao grupo S (100,0±1,332%) ($p<0,05$). A suplementação com óleo de peixe não reverteu este quadro (HCOP 87,21±3,421%), mas também não modificou negativamente este parâmetro nos grupos SOP (93,79±3,860%) e HFOP (88,61±3,655%). O consumo de dieta rica em lipídeos não modificou a expressão protéica de AMPK- α 1 (90,57±3,883%).

A expressão da enzima COX-2 (ciclooxigenase-2) foi normalizada pela expressão de β -actina e apresenta-se em % do grupo S, está demonstrada pela FIGURA 21. Houve redução significativa de 14% da expressão desta enzima no grupo que recebeu dieta rica em lipídeos (85,97±5,885%) em relação ao grupo S (100,0±1,460%) ($p<0,05$). A suplementação com óleo de peixe não reverteu significativamente esta redução (HFOP 92,04±7,456%), e também não alterou nas outras dietas, como SOP (98,17±3,926%) e HCOP (94,74±5,235%). O consumo de dieta rica em carboidratos não modificou a expressão protéica de COX-2 (97,19±3,932%).

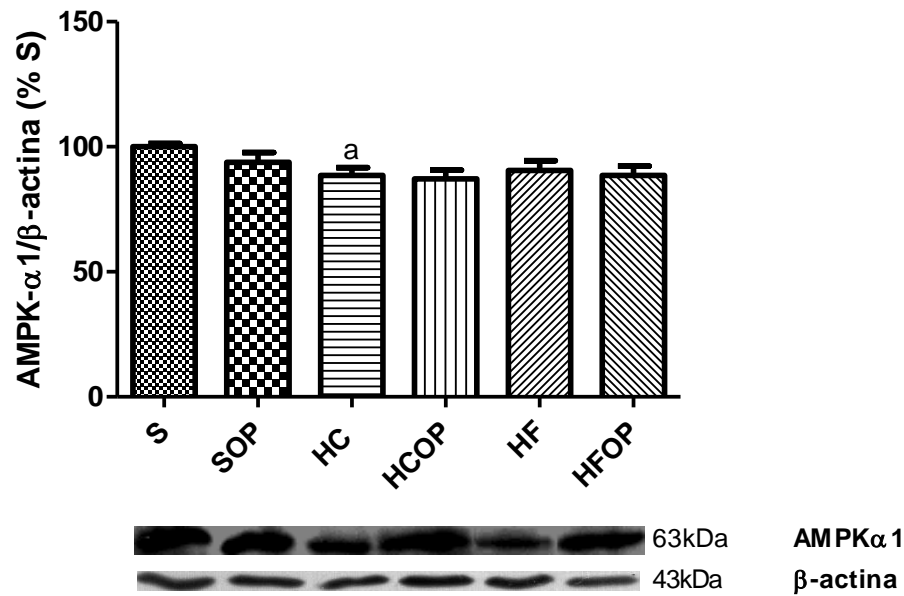


FIGURA 20

Expressão protéica de AMPK- α 1 normalizada por expressão protéica de β -actina dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=11), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=8), com ração rica em carboidrato (HC) (n=7), com suplementação com óleo de peixe (HCOP) (n=6) e com ração rica em lipídeos (HF) (n=9), com a suplementação (HFOP) (n=6). Dados expressos em média \pm EPM. a $p < 0,05$ vs S (realizado teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn).

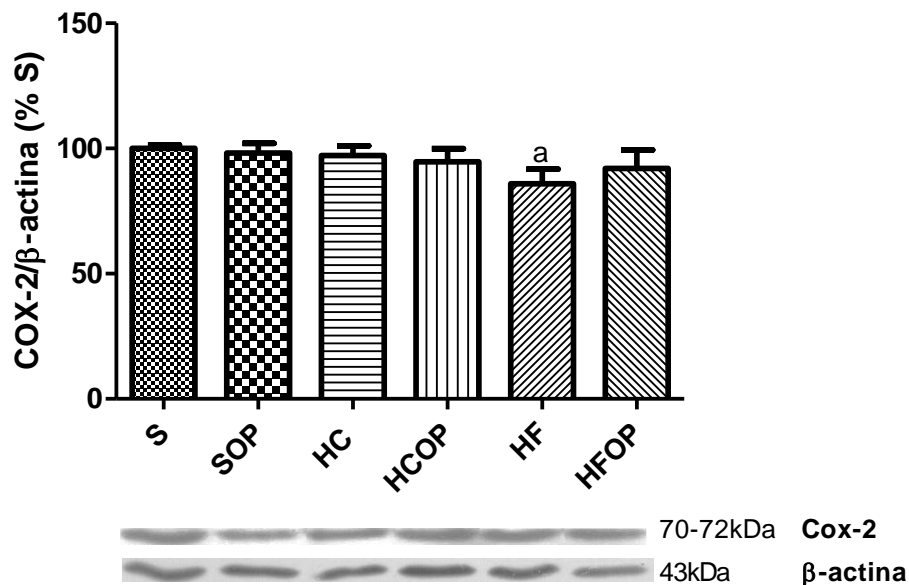


FIGURA 21

Expressão protéica de COX-2 normalizada por expressão protéica de β -actina dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=6), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=5), com ração rica em carboidrato (HC) (n=5), com suplementação com óleo de peixe (HCOP) (n=3) e com ração rica em lipídeos (HF) (n=4), com a suplementação (HFOP) (n=3). Dados expressos em média \pm EPM. a $p < 0,05$ vs S (realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey).

A expressão da unidade p65 do fator nuclear κ B (NF- κ B) foi analisada, normalizada pela expressão de β -actina e apresenta-se em % do grupo S, e está representada pela FIGURA 22. As modificações nas dietas (HC, $102,9 \pm 1,785$; HF, $98,87 \pm 1,907$) não afetaram a expressão de p65 em relação ao grupo S ($100,0 \pm 0,5695$). Além disso, a suplementação com OP não alterou a expressão desta proteína nos três tipos de dietas estudadas (SOP, $104,6 \pm 2,473$; HCOP, $104,5 \pm 1,564$; HFOP, $99,32 \pm 2,182$).

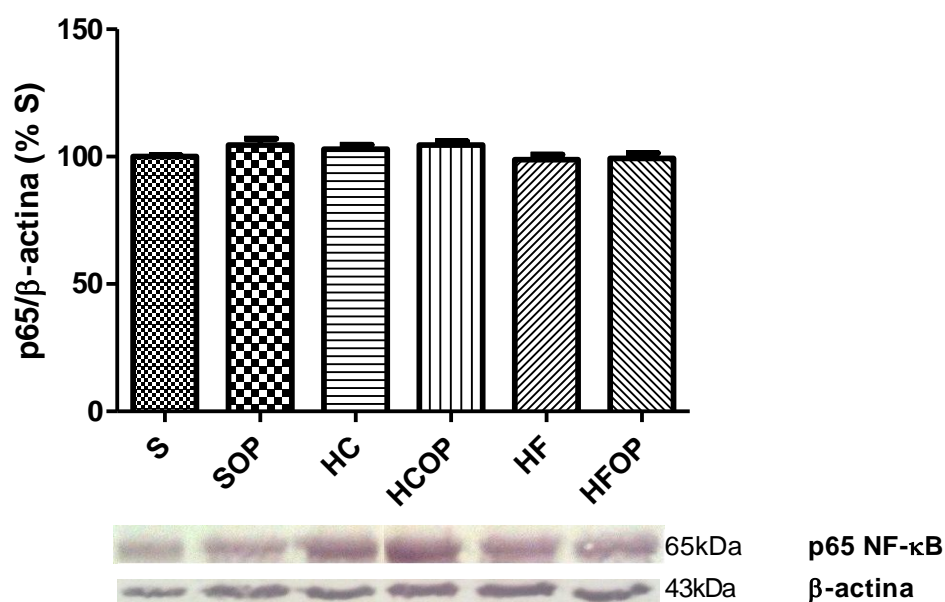


FIGURA 22 Expressão protéica da unidade p65 do fator nuclear κ B (NF- κ B) normalizada por expressão protéica de β -actina dos animais após 4 semanas de suplementação nos grupos ração padrão (S) (n=8), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=7), com ração rica em carboidrato (HC) (n=6), com suplementação com óleo de peixe (HCOP) (n=6) e com ração rica em lipídeos (HF) (n=7), com a suplementação (HFOP) (n=6). Dados expressos em média \pm EPM.

5.2.11 Perfil dos ácidos graxos no tecido renal

A análise do perfil dos ácidos graxos do tecido renal está representada pela TABELA 13. A porcentagem de ácido láurico entre os grupos foi 23 vezes maior no grupo com ração hiperlipídica em comparação com o grupo de ração padrão (HF vs S,

$p < 0,05$). A concentração de EPA foi 7 e 6x maiores nos grupos SOP e HCOP, respectivamente, em relação aos seus controles sem suplementação (SOP vs S, $p < 0,01$; HCOP vs HC, $p < 0,05$). A quantidade de DHA foi aproximadamente 46% maior no grupo SOP em comparação com o S ($p < 0,05$). A porcentagem do ácido graxo mirístico foi diferente quando comparadas as dietas, onde a dieta rica em carboidrato foi 7 vezes maior que o grupo S ($p < 0,05$) e o grupo HF apresentou 85% menos deste ácido graxo em relação ao HC ($p < 0,05$).

Nota-se que as concentrações de ácido araquidônico e linoléico apresentaram modificações entre as dietas e a suplementação. No caso do AA, a dieta HF reduziu 24% em relação a HC ($p < 0,05$) e o HCOP diminuiu 23% em relação ao mesmo grupo (HCOP vs HC, $p < 0,01$). Já nas concentrações de ácido linoléico verifica-se que houve redução de 50 e 20% das dietas HC e HF em relação ao grupo S, respectivamente (HC vs S, $p < 0,0001$; HF vs S, $p < 0,01$), e aumento de 63% da dieta HF em comparação a HC ($p < 0,001$).

A concentração do ácido palmítico foi modificada com redução de 18% pela suplementação de óleo de peixe na dieta padrão (SOP vs S, $p < 0,01$) e do ácido oléico aumentada em 67 e 77% pelos grupos HCOP e HFOP, respectivamente, comparadas ao grupo SOP ($p < 0,05$). Os ácidos graxos α -linolênico e esteárico não apresentaram diferenças significativas entre suas concentrações.

Visto que a suplementação com óleo de peixe é rica em ácidos graxos da família n-3, como o EPA e o DHA, e o metabolismo dos AG n-3 compete ativamente com os AG n-6, assim, a análise da razão entre as duas famílias se faz importante. Em relação a esta razão (n-6/n-3), percebe-se que a suplementação com óleo de peixe reduziu em 27 e 28% este parâmetro nos grupos com ração padrão e rica em carboidratos (SOP vs S, $p < 0,05$; HCOP vs HC, $p < 0,05$) e não apresentou diferença significativa nos grupos com ração hiperlipídica. Os dois ácidos graxos das famílias n-6 e n-3 seriam, respectivamente, o AA e o EPA. A razão destes dois AG foi feita e apresentou alterações em relação à razão n-6/n-3 bruta. A razão AA/EPA foi reduzida em aproximadamente 70 e 60% nos grupos SOP e HFOP em relação aos seus controles sem suplementação (SOP vs S, $p < 0,01$; HFOP vs HF, $p < 0,001$). Neste caso, não houve diferenças significativas em relação aos grupos com dieta rica em carboidrato ($p = 0,06$).

TABELA 13 Perfil de ácidos graxos no tecido renal dos animais após 4 semanas de suplementação dos grupos ração padrão (S) (n=7), com suplementação com óleo de peixe (SOP) (n=7), com ração rica em carboidrato (HC) (n=6), com suplementação com óleo de peixe (HCOP) (n=6) e com ração rica em lipídeos (HF) (n=7), com a suplementação (HFOP) (n=7).

Ácido graxo (% do total)	Grupos					
	S	SOP	HC	HCOP	HF	HFOP
Ácido láurico (12:0)	0,0110±0,007	0,2593±0,128	0,2408±0,034	0,3848±0,196	0,2569±0,073 ^a	0,1610±0,068
EPA (20:5 n-3)	0,1405±0,073	1,000±0,107 ^b	0,2092±0,061	1,264±0,261 ^c	0,3382±0,095	0,7216±0,293
ALA (18:3 n-3)	0,3022±0,095	0,4769±0,161	0,1954±0,050	0,1665±0,069	0,3641±0,104	0,2741±0,112
DHA (22:6 n-3)	16,81±2,518	24,61±1,373 ^d	19,32±3,593	24,27±2,390	22,09±1,874	21,29±1,892
Ácido mirístico (14:0)	0,1724±0,062	0,2490±0,055	1,200±0,4512 ^e	0,4240±0,122	0,1881±0,079 ^f	0,1784±0,074
AA (20:4 n-6)	23,53±2,119	21,81±1,084	26,57±1,288	20,71±1,031 ^g	20,26±1,427 ^f	18,59±1,307
Ácido linoléico (18:2 n-6)	22,67±1,645	21,20±1,892	11,36±0,4067 ^h	11,61±0,7946 ^k	18,55±0,8392 ^{ij}	17,39±0,8229 ^l
Ácido palmítico (16:0)	16,61±0,684	13,67±0,643 ^m	18,26±0,830	16,32±1,848	14,20±1,597	16,22±1,424
Ácido oléico (18:1 n-9)	14,14±1,388	11,52±1,202	20,10±3,020	19,19±2,329 ⁿ	20,95±2,092	20,47±2,433 ⁿ
Ácido esteárico (18:0)	5,556±1,566	4,788±0,5250	5,474±0,7510	5,378±1,196	3,252±0,8987	4,992±0,6801
Razão n-6/n-3	2,303±0,1876	1,693±0,1622 ^d	1,818±0,1869	1,310±0,1279 ^o	1,763±0,1465	1,522±0,0749
Razão AA/EPA	81,95±20,71	23,20±2,540 ^m	145,3±44,52	12,57±0,1427	46,50±2,556	19,06±4,066 ^p

Dados expressos em média ± EPM. a p<0,05 vs S; b p<0,01 vs S; c p<0,05 vs HC; d p<0,05 vs S; e p<0,05 vs S; f p<0,05 vs HC; g p<0,01 vs HC; h p<0,0001 vs S; i p<0,01 vs S; j p<0,001 vs HC; k p<0,001 vs SOP; l p<0,05 vs HCOP; m p<0,01 vs S; n p<0,05 vs SOP; o p<0,05 vs HC; p p<0,001 vs HF (a realizado teste Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn; b, c, teste t não paramétrico – teste de Mann-Whitney; d, g, m, o, p realizado teste t não pareado; e, f, h, i, j, k, l, n realizada análise de variância de uma via com pós-teste de Tukey). Sendo que EPA: ácido eicosapentaenóico, ALA: ácido α-linolênico, DHA: ácido docosahexaenóico, AA: ácido araquidônico.

6 DISCUSSÃO

6.1 OBESIDADE E RESISTÊNCIA INSULINA INDUZIDA PELA DIETA

A Organização Mundial da Saúde indicou que em 2005 a prevalência mundial em adultos em sobrepeso era de aproximadamente 1,6 bilhões de pessoas e os obesos chegavam a 400 milhões. Esta quantia representa que um quarto de toda a população mundial apresenta aumentado risco de desenvolver doença cardiovascular, diabetes, hipertensão, alguns tipos de cânceres e doença renal crônica. As projeções para 2015 são que os números de adultos com sobrepeso chegariam a 2,3 bilhões e os com obesidade em torno de 700 milhões (HARIRI; THIBAUT, 2010; FARAG; GABALLA, 2011).

Os fatores genéticos apresentam grande importância no controle do peso, composição corporal e na regulação da resposta metabólica frente à alimentação nos humanos e nos animais. Entretanto, quando percebemos que a prevalência de sobrepeso e obesidade aumenta em curto espaço de tempo verificamos que este fato não pode ser explicado somente pela genética e sim pela suscetibilidade genética em conjunto com fatores ambientais, como a dieta (JÉQUIER, 2002; HARIRI; THIBAUT, 2010).

Uma dieta rica em lipídeos pode ser responsável pelo aumento da adiposidade não só em humanos, mas também em animais. Tanto em ratos, quanto em camundongos, há uma relação positiva entre a concentração de lipídeos na dieta e o ganho de peso e o ganho de tecido adiposo (HARIRI; THIBAUT, 2010).

Este estudo foi conduzido utilizando camundongos *Swiss* que consumiram duas dietas modificadas e uma dieta comercial, esta última, aqui denominada padrão ou *standard*. As dietas modificadas apresentaram como base para sua manipulação a composição desenvolvida por um comitê formado pelo *American Institute of Nutrition* (AIN) para identificar dietas adequadas para estudos nutricionais com roedores em laboratórios, este comitê definiu a composição ideal das dietas em 1993 e esta foi

chamada de AIN93 (REEVES, 1997).

Sendo assim, a dieta hiperlipídica usada (HF) foi obtida a partir da AIN93 com modificações citadas em trabalho de ARAÚJO e colaboradores (2007), permanecendo com 26% de energia oriunda dos carboidratos, 15% das proteínas e 59% dos lipídeos. Já a dieta rica em carboidratos (HC) não sofreu modificações a partir da AIN93 e apresentou em porcentagem de calorias em macronutrientes: 75,8% de carboidratos, 14,7% de proteínas e 9,5% de lipídeos. A composição das dietas HF e HC estão descritas na TABELA 1 e 2. A última dieta utilizada foi a ração padrão NUVILAB CR1® (Sorgob, São Paulo, SP, Brasil) que apresentava em porcentagem de energia oriundas de macronutrientes: 63,4% de carboidratos, 25,6% de proteínas e 11% de lipídeos.

Durante oito semanas os animais receberam a dieta *standard*, a rica em carboidratos e a hiperlipídica, este período foi considerado o período de indução do modelo de obesidade e foram avaliados para confirmar a indução o ganho de peso e o teste de tolerância intraperitoneal à glicose.

Como discutido anteriormente e mostrado na TABELA 4, a dieta hiperlipídica foi capaz de gerar maior ganho de peso corporal em relação às outras dietas analisadas, aumento em 80% em relação ao grupo S e em 40% ao grupo HC, sendo considerado um bom modelo de indução da obesidade, com aumento de peso diretamente proporcional à quantidade de lipídeos na dieta. Em relação ao grupo que recebeu dieta rica em carboidratos, é possível perceber que este também gerou uma porcentagem de ganho de peso maior em 30% em relação ao grupo com dieta padrão.

O aumento do peso corporal está diretamente envolvido com a seleção do combustível energético utilizado após a refeição. Esta seleção dependerá da concentração plasmática de glicose e de ácidos graxos livres e da secreção de insulina. A insulina promove a entrada e oxidação de glicose nas células em tecidos sensíveis a este hormônio. Ainda, a insulina também suprime a atividade da lipase hormônio sensível, inibindo a lipólise e a oxidação lipídica. Após uma refeição rica em carboidratos, a secreção de insulina é estimulada, juntamente com a oxidação de glicose, o que promove a inibição da oxidação lipídica, permitindo o estoque de lipídeos no tecido adiposo. Em contraste, em uma refeição rica em lipídeos, estes são preferencialmente depositados no tecido adiposo com a oxidação lipídica inibida.

Prioritariamente, a oxidação de carboidratos excede a de lipídeos, já que ocorre durante as 24 horas do dia principalmente pelo estoque limitante de glicogênio. A oxidação de lipídeos somente ocorre quando o balanço energético se torna negativo com os lipídeos endógenos oxidados para amenizar o déficit energético. Sendo assim, a eficiência da utilização de lipídeos como substrato energético sugere que este teria o maior potencial para induzir o ganho de peso em relação à dieta rica em carboidratos, mesmo esta tendo um efeito indireto do ganho de peso, pela redução da oxidação de lipídeos (JÉQUIER, 2002; HARIRI; THIBAUT, 2010).

Mesmo com aumento de ganho de peso, é possível perceber uma redução no consumo da dieta hiperlipídica em quantidade (em 60% vs S e 50% vs HC) e energeticamente (em 35% vs S) em relação às outras dietas. Isso pode ocorrer pelo efeito sacietógeno dos lipídeos, com aumento do tempo de esvaziamento gástrico e de absorção de nutrientes. A dieta rica em carboidratos também apresentou uma redução em 20% em relação à quantidade e em 40% em energia em relação à dieta padrão.

A dieta modificada denominada rica em carboidratos apresenta em sua composição em macronutrientes porcentagens até menores de carboidratos que o grupo denominado *standard*. Entretanto, neste caso, o foco da análise está na fonte de carboidratos que compõe as duas rações. A ração HC apresenta como fonte de carboidratos: amido de milho purificado e sacarose, ou seja, carboidratos refinados, adicionado com baixa concentração de celulose, como fonte de fibras, e a ração padrão é composta por: milho integral moído e farelo de trigo, ou seja, maior teor de carboidratos integrais, com maior composição de fibras, como mostrado na TABELA 1 e descrito na metodologia do trabalho.

Fontes diversas de carboidratos dietéticos apresentam taxas de digestão e absorção diferentes o que diretamente afeta a resposta glicêmica e insulínica. A resposta glicêmica ou a capacidade de elevação da glicemia após a digestão é chamada de índice glicêmico. O índice glicêmico é calculado pelo incremento na área sob a curva glicêmica após o consumo de 50g do carboidrato a ser testado dividido pela área sob a curva após consumo de 50g de carboidrato de referência, normalmente glicose ou pão branco. Assim, quanto mais refinado e simples for o carboidrato, maior será seu índice glicêmico (BRAND-MILLER *et al.*, 2002; LUDWIG, 2002). Além disso, o

consumo de uma dieta com alto índice glicêmico, com altas concentrações de carboidratos eleva o risco de desenvolvimento de diabetes, obesidade e doença cardíaca coronária (WOLEVER; MEHLING, 2003; EBBELING *et al.*, 2005).

A ração HC apresenta então, por suas fontes de carboidratos serem refinadas, moderadamente complexas e sem fibras, possivelmente um alto índice glicêmico. Já os carboidratos da ração *standard* por serem complexos, integrais e com maior teor de fibras, seriam considerados com baixo índice glicêmico. Mas como se explica o maior ganho de peso e desenvolvimento da obesidade por uma dieta com alto índice glicêmico?

Após o consumo de uma refeição com alto índice glicêmico, as concentrações de insulina aumentam drasticamente, levando diretamente a rápida redução da glicemia e de ácidos graxos livres no plasma, estimulando a oxidação da glicose e lipogênese. Então, entre 3 a 5 horas pós-prandial, as concentrações dos dois maiores metabólitos energéticos circulantes caem simultaneamente, uma situação que pode ser interpretada no sistema nervoso central como estado de baixo combustível energético, onde estimula o requerimento de alimento (BRAND-MILLER *et al.*, 2002; LUDWIG, 2002). Como no nosso caso a ração HC era única fonte de alimento que os animais deste grupo recebiam, neste possível período de escassez energética, a ração HC era novamente consumida o que gerava novo ciclo de hiperglicemia, lipogênese, hipoglicemia e maior consumo de alimento, o que pode ter colaborado para o ganho de peso deste grupo. Entretanto, o consumo da dieta rica em carboidrato ainda permaneceu menor em quantidade e em calorias em relação ao consumo da dieta padrão, devido possivelmente à quantidade em gramas e em calorias oriundas das fibras dietéticas na dieta padrão que na verdade não são utilizadas como fonte de energia e que reduzem o trânsito intestinal e a digestão e a absorção de nutrientes, particularmente carboidratos e gorduras, auxiliando no controle do peso corporal (BURTON-FREEMAN, 2000; MARLETT; MCBURNEY; SLAVIN, 2002).

A chamada “diabesidade” é um termo atualmente utilizado para descrever o diabetes ou o quadro com início de resistência à insulina no contexto da obesidade. Ou ainda, em alguns casos se refere ao diabetes dependente da obesidade (FARAG; GABALLA, 2011). Sendo assim, o outro parâmetro analisado para confirmação da

indução do quadro de obesidade foi o teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTIG) para verificar a geração de quadro de intolerância à glicose e, possivelmente, resistência à insulina.

Como representado na FIGURA 5 e descrito na TABELA 3, o grupo HF apresentou todas as glicemias do TTIG maiores ou que o grupo S e em alguns casos, maiores que o HC. A dieta HC, neste caso, apresentou aumentos nas glicemias no início e no final do teste em comparação ao grupo S. A partir do TTIG, foi calculada a área sob a curva (AUC) e como já descrita nos resultados, esta representa, de uma forma global, a capacidade da insulina em reduzir a valores basais a glicemia após um desafio, neste caso a injeção intraperitoneal de glicose a 2g/kg de peso corporal.

Na FIGURA 6 está representada a AUC dos grupos experimentais. Como o grupo HF apresentou todas as glicemias aumentadas em relação principalmente ao grupo S, este gerou uma AUC 60% maior comparado ao grupo S. Já a dieta HC, como apresentou um aumento somente no início e no final do TTIG e a AUC representa a capacidade de retornar aos valores de início, seus valores de AUC não foram modificados em relação ao grupo S.

O cenário gerado pela obesidade em induzir à resistência à insulina, intolerância à glicose e, progressivamente, o diabetes ocorre por diversos mecanismos. A inflamação gerada pela obesidade, por aumento na secreção, pelo próprio tecido adiposo, de citocinas pró-inflamatórias pode afetar o grau de sensibilidade à insulina atuando via proteínas na cascata de sinalização celular (GREENBERG; McDANIEL, 2002). Além disso, no diabetes é característica progressiva falência das células β pancreáticas que secretam insulina, frequentemente associado ao modelo comentado de diabetes. O mecanismo fisiopatológico dessa falência apresenta dois caminhos: o primeiro sugere-se um dano celular pelo estresse oxidativo pela elevação da glicose plasmática, e o segundo seria a apoptose das células β causada por acúmulo ectópico de gordura no pâncreas. Os dois mecanismos propostos podem se combinar entre si e ocorrer mutuamente (KOLB; MANDRUP-POULSEN, 2005; JÜRGENS *et al.*, 2007). Sendo assim, dieta HF foi capaz de gerar aumento do peso corporal, além de ter induzido quadro de intolerância à glicose, característico da diabetes.

Como comentado por HARIRI e THIBAUT (2010), dietas ricas em carboidratos

não são um bom modelo de indução de obesidade como a dieta hiperlipídica e corrobora ao que foi encontrado neste trabalho. A dieta HC, não gerou intolerância à glicose, mesmo tendo alguns pontos da glicemia acima da normalidade no TTIG. Essa singela alteração pode ser devido ao aumento moderado de peso, não afetando possivelmente a via de sinalização de insulina ou, ainda, a secreção de insulina pode ser suficientemente capaz de reduzir a glicemia, tendo um pico inicial acima do grupo S e após, com a resposta insulínica ativada, reduz a curva glicemia a valores normais. Essa situação é característica de quadro de resistência à insulina e intolerância à glicose iniciais (KOLB; MANDRUP-POULSEN, 2005).

6.2 PAPEL DAS SUPLEMENTAÇÕES NO MODELO EXPERIMENTAL

6.2.1 Parâmetros metabólicos

Após o período de oito semanas para indução do modelo experimental, os animais foram novamente distribuídos e receberam as suplementações com óleo de peixe, com óleo de girassol ou nenhuma suplementação por mais quatro semanas de consumo, permanecendo com os grupos S, SOP, SOG, HC, HCOP, HCOG, HF, HFOP e HFOG, como descrito na metodologia deste trabalho. Durante este período de quatro semanas foram coletadas informações a respeito do ganho de peso de cada animal e ao término deste período foi realizado novamente o teste de tolerância intraperitoneal à glicose e posteriormente a coleta de material, como plasma, urina, tecidos para outras metodologias.

Os grupos que receberam dieta hiperlipídica iniciaram a suplementação com valores de massa corporal já elevados, confirmando o período de indução. Após a suplementação o ganho de peso destes mesmos animais permaneceu inalterado, com peso final ainda maior que os dos grupos com dieta padrão, mas não apresentando modificações no parâmetro de ganho de peso, exceto no grupo HFOP que apresentou

maior ganho de peso que o grupo SOP, entretanto essa alteração não pode considerada, visto que o próprio grupo SOP apresentou redução neste parâmetro em relação ao seu controle S (TABELA 5).

Dentre os grupos com ração HC, inicialmente o grupo com suplementação com óleo de girassol apresenta menor peso corporal inicial e final comparado ao grupo HC. Entretanto, o grupo HCOP mesmo não apresentando peso inicial maior, apresentou aumento do ganho de peso em relação ao SOP, gerando peso final elevado em relação ao mesmo grupo.

As modificações ocorridas nos pesos durante as quatro semanas foram mais frequentes nos grupos com algum tipo de suplementação, o que poderia levantar a questão de que poderia ser a suplementação com óleo que geraria o aumento de peso encontrado. Contudo, esse aumento de peso não ocorre nos grupos com ração padrão, o que refutaria a idéia da suplementação causar aumento de peso por si só. A suplementação de óleo de peixe ou óleo de girassol era fornecida na dose de 1g/kg peso corporal. Considerando que um camundongo tenha 50g de peso corporal, ele receberia 50µL de óleo, e que o consumo de ração diário é em média 25kcal/dia, o acréscimo energético diário oferecido pela suplementação seria em torno de 2-3%, o que não poderia explicar aumento de peso corporal.

O teste de tolerância intraperitoneal à glicose foi realizado com os nove grupos experimentais e está representado na FIGURA 7 e os valores das glicemias nos diferentes tempos mostrados na TABELA 6. A curva glicêmica mostrada foi dividida em três gráficos, um para cada ração utilizada, para facilitar a visualização, permanecendo a mesma escala nos eixos dos gráficos. Foi possível perceber que dentre o grupo com ração padrão, o óleo de girassol gerou uma alteração na curva glicêmica, com elevação em alguns pontos da glicemia, com consequente elevação da área sob a curva em relação ao grupo S (FIGURA 8). Dentre os grupos com ração rica em carboidratos, a curva glicêmica e a AUC permaneceu inalterada, exceto pela glicemia basal do grupo HCOG ser aproximadamente 30% maior que no SOG. Isso mostra novamente que a resistência à insulina não foi instalada nos grupos que receberam a ração rica em carboidrato. Todavia, os grupos com ração hiperlipídica apresentaram aumento das glicemias em todos os tempos analisados em relação os seus respectivos grupos com

ração padrão (S vs HF; SOP vs HFOP e SOG vs HFOG) e aumentos na maioria dos tempos em relação aos seus respectivos grupos com ração rica em carboidrato. Esse deslocamento da curva glicêmica foi percebido na AUC destes grupos, onde apresentaram o mesmo padrão de aumento em comparação com os respectivos grupos com ração padrão e ração rica em carboidrato. Não houve diferenças entre os grupos HFOP e HFOG em comparação ao HF, sendo que as suplementações com OP ou OG não afetaram positivamente a curva glicêmica ou a AUC nos grupos com ração HF.

Contrapondo o que foi encontrado, em trabalho de KALUPAHANA e colaboradores (2010), o ácido eicosapentaenóico, da família de ácidos graxos n-3, foi capaz minimizar a resistência insulínica gerada por dieta rica em lipídeos (45% kcal em lipídeos) mediante redução da inflamação do tecido adiposo e lipogênese e, ainda, elevando a oxidação de lipídeos. Entretanto, vale ressaltar, que neste trabalho foram utilizados camundongos C57BL/6J e que o EPA, que foi adicionado à ração HF na dose de 36g de EPA/kg de ração, foi oferecido de duas formas: grupo que recebeu dieta enriquecida com EPA desde o início do experimento e outro que recebeu a mesma ração após o período de indução da obesidade de seis semanas. As modificações encontradas minimizando a resistência insulínica foram nos grupos que receberam EPA, desde o início ou após a indução com a ração hiperlipídica, avaliando um efeito protetor e terapêutico do AGPI n-3. Associado às alterações nos parâmetros de resistência à insulina, o grupo que recebeu na ração EPA desde o início apresentou menor ganho de peso em relação ao grupo HF, e o que recebeu EPA após o período de indução apresentou o mesmo perfil de curva de ganho de peso que o grupo HF, fato encontrado no nosso trabalho.

O modelo de diabetes, quando instalado, é caracterizado com quadro de hiperglicemia e hipoinsulinemia, pela alteração celular e possível falência nas células β pancreáticas. A obesidade gerada pela dieta hiperlipídica pode apresentar efeitos de “lipotoxicidade”, pelo acúmulo ectópico de gordura e aumento dos ácidos graxos livres, e de “glicotoxicidade”, pela elevação da glicemia pós-prandial, fatores considerados agravantes no desenvolvimento da falência das células β pancreáticas, sendo que o desenvolvimento da falência celular pode durar longos períodos (JÜRGENS *et al.*, 2007).

Entretanto, a indução de obesidade com resistência à insulina pode apresentar alguns fatos contraditórios. Estudo de CARVALHO *et al.* (2012) foi verificado um aumento expressivo da insulinemia nos animais que receberam dieta hiperlipídica, além da curva glicêmica e a AUC se deslocarem negativamente, demonstrando intolerância à glicose e resistência à insulina. Mesmo o nosso trabalho tendo utilizado a metodologia de indução de obesidade deste trabalho acima citado, a insulinemia dos animais não foi aumentada nos animais HF (FIGURA 9). É possível que a secreção de insulina compensatória, para manter a glicemia normal, não esteja sendo suficiente para reduzir a hiperglicemia (dados mostrados anteriormente) e a insulina secretada ou está aumentada, tendendo a compensação, ou está em condições próximas ao normal. Possivelmente a dieta hiperlipídica seja capaz de gerar um quadro completo de diabetes, com hiperglicemia e hipoinsulinemia, porém, com doze semanas de dieta, encontramos um processo parcial deste fenômeno.

Além disso, o grupo HFOG apresentou uma compensação na secreção de insulina 3 vezes maior que os valores do grupo HF, podendo caracterizar um quadro de resistência à insulina, pois a glicemia, mesmo com a hiperinsulinemia compensatória, permanece elevada (KOLB; MANDRUP-POULSEN, 2005). Já a secreção de insulina no grupo HFOP foi maior, mas somente quando comparado aos respectivos grupos nas diferentes dietas (SOP e HCOP), não tendo o papel do OP neste caso. Entretanto, no estudo já citado de KALUPAHANA *et al.* (2010), o EPA foi capaz de reduzir a insulinemia dos animais com dieta HF tanto com o consumo de dieta com EPA desde o início dos experimento, quanto após as seis semanas de indução do modelo.

Entre os grupos com dieta rica em carboidrato, o OP reduziu, mas não significativamente, a insulinemia dos animais. O óleo de girassol não afetou este parâmetro associado à dieta HC. Contudo, dentre os grupos com dieta padrão, a insulinemia dos animais do grupo SOG foi elevada em relação ao grupo S, condizentemente com a elevação da AUC e deslocamento da curva glicêmica no teste de tolerância à glicose. Este quadro não apresenta um fato alarmante, mas seria indicio de alguma alteração metabólica pode ser causado pelo OG, rico em AGPI n-6, mesmo sem alteração do peso corporal dos animais.

Para tentar avaliar o ganho de peso corporal dos animais em estudo, foram

mensurados os pesos de diferentes tecidos corporais. Os tecidos adiposos (TA) epididimal e retroperitoneal foram pesados, juntamente com o rim, e são encontrados descritos na TABELA 7. O consumo das duas rações modificadas usadas neste estudo foi capaz de gerar maior acúmulo de gordura epididimal e retroperitoneal em comparação com o grupo com consumo de ração padrão. Não houve nenhum papel protetor do OP neste acúmulo de TA. Entretanto, nos dois TA analisados o acúmulo de gordura foi maior nos grupos HF em relação aos grupos HC, verificando novamente que a dieta hiperlipídica é mais eficaz em induzir a obesidade animal.

Além disso, foi realizado um cálculo para normalizar os valores de tecidos adiposos em relação à sua massa e estimar a porcentagem de gordura corporal nos animais, realizando o índice de adiposidade (TAYLOR; PHILLIPS, 1996). Este resultado foi condizente com as análises realizadas com cada tecido adiposo separadamente, sendo que as duas rações, HC e HF, apresentaram aumentos em relação aos grupos com ração S. Entretanto, os grupos HFOP e HFOG apresentaram aumentos acima dos grupos HCOP e HCOG, respectivamente. Além disso, não foram encontradas diferenças sobre o papel da suplementação sobre uma possível redução do tecido adiposo.

Estudos clínicos e epidemiológicos demonstram que é característica da injúria renal induzida pela obesidade a hipertrofia glomerular, espessamento da membrana basal glomerular, expansão de matriz mesangial e inflamação do tecido renal. Como consequência destas alterações é possível perceber um aumento da massa renal em indivíduos obesos (WU *et al.*, 2006). O consumo de dieta hiperlipídica (60% total de calorias oriundas da dieta) em uma semana já foi capaz de aumentar a massa do tecido renal total e a massa do rim normalizada pelo comprimento da tibia em camundongos C57BL/6J em trabalho de DECLÈVES *et al.* (2011). Além disso, esse aumento foi contínuo com o consumo da ração HF nas doze semanas em estudo. Entretanto, a dieta hiperlipídica no presente estudo não foi capaz de gerar aumento do tecido renal, apresentando até redução deste parâmetro em relação ao grupo com ração padrão (TABELA 7). Contudo é necessário ressaltar que os camundongos C57BL/6J, utilizados em estudo comentado acima apresentam uma mutação no cromossomo 6, realizada inicialmente no Laboratório Jackson, os que o tornam mais suscetíveis ao

desenvolvimento da obesidade, o que associado ao consumo com dieta hiperlipídica pode acarretar alterações mais relevantes que no modelo proposto neste trabalho (SRINIVASAN; RAMARAO, 2007).

Com o teste de tolerância intraperitoneal à glicose foi possível obter a glicemia basal em jejum dos animais em estudo, entretanto esta medida foi feita por glicosímetro a partir de sangue total periférico, que apresenta suas limitações. Além desta dosagem, para tentar amenizar estas limitações foi realizada a análise da glicemia em jejum diretamente do plasma dos animais por kit específico descrito na metodologia deste trabalho no dia de coleta dos tecidos.

Os valores da glicemia, juntamente com os valores do perfil lipídico dos grupos experimentais após jejum de 12h, estão mostrados na TABELA 8. Os grupos com dieta hiperlipídica apresentaram glicemias aumentadas em relação aos respectivos grupos com ração padrão, além do HFOP e HFOG terem elevado a glicemia em relação aos grupos HCOP e HCOG, respectivamente. Os grupos com dieta HC, de uma forma geral, aumentaram a glicemia em comparação aos seus respectivos grupos com ração padrão, exceto pelo grupo HCOP que não apresentou aumento significativo em relação ao SOP, fato este relacionado com a menor insulinemia encontrada neste grupo (dado sem diferença estatística $p=0,09$). Outra alteração derivada do papel da suplementação se deu no grupo HFOG, que como comentado aumentou este parâmetro em relação aos grupos SOG e HCOG, elevou em 40% a glicemia em relação ao grupo HF, mesmo apresentando hiperinsulinemia, valor 3x maior que seu controle (HF).

Ainda na TABELA 8, verificamos que a dosagem plasmática de triacilgliceróis não foi afetada pelas diferentes dietas modificadas. Entretanto a suplementação com óleo de girassol no grupo que recebeu dieta rica em carboidrato reduziu em 55% este parâmetro em relação ao seu controle sem suplementação (HC).

As dietas HC e HF foram capazes de aumentar a colesterolemia dos animais em estudo. Dentre as suplementações, tanto o OP, quanto o OG nos grupos com ração hiperlipídica foram capazes de aumentar a colesterolemia, entretanto, o grupo HFOG não foi diferente estatisticamente do SOG, visto que este foi capaz de gerar aumento deste mesmo parâmetro em comparação ao grupo S. Dentre os grupos que receberam ração rica em carboidratos, o OP foi capaz de atenuar o aumento da colesterolemia

gerada pela dieta HC, não apresentando diferença estatística em relação ao grupo SOP. O HCOG apresentou a mesma elevação que seu grupo sem suplementação, mas como no caso do grupo HFOG, não foi diferente do SOG, visto que este teve por si só alteração neste parâmetro.

A saturação dos lipídeos dietéticos, como no caso da nossa ração HF, é considerada um dos principais fatores modulatórios da concentração de colesterol plasmático. Além disso, em humanos o consumo de ácidos graxos saturados é fator primordial no aumento do LDL. O aumento do colesterol pela dieta rica em carboidratos pode ser devido ao aumento da síntese hepática de lipídeos, dados encontrados em nosso grupo de pesquisa, mas ainda não publicado, e pelo aumento da oxidação glicolítica e da lipogênese (JÉQUIER, 2002; FERNANDEZ; WEST, 2005).

O aumento dos valores do colesterol total no grupo SOG pode ser devido à elevação da concentração plasmática de LDL. Neste caso as dietas HC e HF não elevaram este parâmetro. Entretanto, visto o aumento excessivo do grupo SOG, os grupos HCOG e HFOG foram estatisticamente menores que SOG, mesmo não apresentando diferenças entre seus grupos com a mesma ração (HC e HF, respectivamente). O aumento do colesterol total pelo AGPI n-6 também foi encontrado em estudo com cachorros normais da raça Beagle, com suplementação durante 8 semanas. Neste caso a fonte de n-6 foi o óleo de milho e a concentração de LDL não foi avaliada pelo estudo. Além disso, esta suplementação piorou os parâmetros de sistema imunitário avaliados (WANDER *et al.*, 1997).

Analisando o papel do OP sobre a dieta HC na glicemia, insulinemia e lipídeos séricos até aqui comentados, este foi capaz de amenizar os prejuízos gerados pela dieta, não apresentando um efeito terapêutico, mas tentando evitar a progressão da doença. Alguns estudos já analisaram o papel do OP sobre dietas rica em carboidratos, principalmente em sacarose e frutose, e principalmente nestes casos, o OP foi capaz de prevenir a dislipidemia e a hiperinsulinemia desenvolvida no modelo experimental (LOMBARDO; CHICCO, 2006).

Historicamente, existe uma forte correlação inversa entre a concentração plasmática de HDL e o risco de desenvolvimento da doença cardiovascular, isto é devido ao seu efeito ateroprotetor em modelos animais de aterosclerose progressiva.

Modelos de obesidade normalmente se correlacionam com dislipidemia, hipertensão e aterosclerose. Entretanto, em alguns trabalhos, os humanos obesos não apresentam alterações no perfil de triacilgliceróis, colesterol total, LDL, além de não reduzirem o HDL em relação aos indivíduos considerados magros (WOLOVER; MEHLING, 2003; FEIG *et al.*, 2011).

No modelo experimental de obesidade proposto, foi observado um incremento significativo no colesterol total, mas as concentrações de HDL não apresentaram o perfil esperado. As dietas HC e HF apresentaram um aumento expressivo neste parâmetro em relação aos respectivos grupos com ração padrão. As suplementações com OP e OG, em alguns casos, como HCOP, HCOG e HFOG, apresentaram aumentos em relação aos seus grupos com a mesma dieta sem suplementação (HC vs HCOP e HCOG e HF vs HFOG).

6.2.2 Função renal

A obesidade e, frequentemente, o sobrepeso são associados a modificações na hemodinâmica, fisiologia e estrutura renais. Dentre as alterações hemodinâmicas descritas nas etapas iniciais desta patologia temos o aumento do fluxo plasmático efetivo, da taxa de filtração glomerular e da fração de filtração. Modificações anatômicas associadas à obesidade incluem elevação do tamanho do glomérulo, aumento da matriz mesangial e proliferação das células mesangiais, redução no número e hipertrofia dos podócitos, aumento da largura dos processos podais dos podócitos e da prevalência de esclerose global e segmental (KOPPLE; FERROZE, 2011).

A taxa de filtração glomerular (TFG), estimada neste trabalho pelo *clearance* de creatinina, é o principal parâmetro utilizado para classificação do grau do desenvolvimento da doença renal crônica. Durante o desenvolvimento da doença renal crônica em pacientes obesos, a taxa de filtração glomerular varia dependendo do grau de falência renal e de obesidade. Inicialmente a TFG pode se apresentar em valores acima da normalidade caracterizando o quadro denominado “hiperfiltração

compensatória”. Ao longo do tempo, este quadro pode gerar lesões celulares, em túbulos e glomérulos, podendo causar falência renal e durante este processo reduzir progressivamente a TFG (HALL *et al.* 2004; VAN BIESEN *et al.*, 2007).

Ainda, o aumento da TFG na obesidade pode ser devido à dilatação da arteríola aferente como resultado da reabsorção proximal de sal associado com vasoconstrição da arteríola eferente renal pela resultante da elevação da angiotensina II, estimulada principalmente pela ativação do sistema nervoso simpático. Esses eventos contribuem para hiperfiltração, glomerulomegalia e posterior glomeruloesclerose focal. O aumento da reabsorção proximal de sal promove redução deste na porção da mácula densa que gera vasodilatação na aferente, secreção de renina e hiperfiltração. Todavia, a hiperfiltração na obesidade não ocorre na plenitude dos casos. Em alguns trabalhos, o aumento do índice de massa corporal está relacionado com a redução da TFG, aumento da resistência vascular renal e redução do fluxo efetivo renal. Outro parâmetro é a relação cintura-quadril, que apresenta associação com a resistência vascular renal (HALL, 2003; WAHBA; MAK, 2007).

No caso dos grupos experimentais em estudo, o *clearance* de creatinina foi menor (FIGURA 10), de uma forma geral, nas dietas modificadas, rica em carboidrato e rica em lipídeos. Todos os grupos HC e HF aumentaram a massa adiposa, entretanto, somente o HC não aumentou o peso corporal, o que pode ter promovido aumento da pressão intra-abdominal, com redução da *clearance* de creatinina e progressivamente menor peso do rim. Já o grupo HFOP pode ter apresentado o mesmo perfil, já que foi o grupo com maior acúmulo de tecido adiposo, com aumento não proporcional do peso corporal. Esse possível aumento da pressão intra-abdominal pelo acúmulo de tecido adiposo visceral é fator de comum ocorrência em indivíduos obesos. A redução da TFG pode ser causada pela compressão da veia renal, o que aumenta a pressão venosa renal e reduz a perfusão tecidual. Adicionado a este mecanismo, o aumento da pressão intra-abdominal pode aumentar a pressão da veia cava o que alteraria o fluxo venoso retrógrado através das veias renais (WAHBA; MAK, 2007).

A função renal pode ser avaliada indiretamente por alterações nas concentrações plasmáticas de uréia e creatinina. A uréia é quantitativamente o maior produto do metabolismo protéico, já a creatinina é um produto da quebra de creatina e

fosfocreatina, ácidos orgânicos nitrogenados envolvidos no metabolismo energético das células musculares esqueléticas. Aumento das concentrações de creatinina e uréia indicam diminuição da TFG, sendo que os valores deste metabólito são influenciados fortemente pela massa muscular do indivíduo. Assim, pacientes que apresentam redução da massa muscular, como em doenças crônicas, podem apresentar valores reduzidos de TFG mesmo com valores normais de creatinina plasmática. Além disso, aumentos nas concentrações de uréia podem representar catabolismo protéico, por alguma enfermidade ou por excesso de ingestão dietética de proteínas (KOOMAN, 2009).

A concentração de creatinina plasmática não foi afetada significativamente pelas dietas ou pelas suplementações (TABELA 9). Já a concentração de uréia foi reduzida tanto nos grupos que receberam ração hiperlipídica, quanto nos animais com ração rica em carboidrato. Considerando que a uremia elevada pode estar presente em casos de ingestão protéica pela dieta em excesso, há possibilidade da redução da uremia encontrada nos grupos HC e HF, com ou sem suplementação, ser devida à redução da ingestão de proteínas pelas respectivas dietas. Como mostrado na TABELA 2 e já comentado, o valor energético oriundo das proteínas na ração HC e HF eram, respectivamente, 14,7 e 15%, já o conteúdo protéico na ração padrão ficava em torno de 25%. Além disso, como mostrado e discutido anteriormente, o consumo de ração padrão era maior que nos grupos com dietas modificadas, o que poderia agravar ainda mais o quadro de baixa ingestão protéica.

Porém, mesmo com redução na ingestão de proteínas pela dieta, esses animais não estavam em catabolismo intenso ou desnutrição. Isso porque, um marcador de desnutrição é a concentração plasmática de proteínas totais. Este parâmetro, descrito na TABELA 9, não sofreu modificações nos grupos em estudo, confirmando que a menor ingestão de proteínas encontrada nos grupos com dieta HC e HF não afetou o estado nutricional dos animais, possivelmente somente a concentração plasmática de uréia.

A obesidade é frequentemente associada com uma alta incidência de proteinúria, apresentando uma relação positiva entre quanto maior é o aumento do peso corporal, mais severa pode ser a proteinúria, o que aumenta a prevalência de doença crônica

renal e acelera a progressão à falência renal e da doença renal de estágio final (KOPPLE; FERROZE, 2011).

A dosagem da excreção urinária de proteínas totais foi realizada e foi normalizada pela concentração urinária de creatinina, e está descrita na TABELA 9. Somente o grupo HC apresentou um incremento na excreção urinária de proteínas totais em relação ao grupo S. A dieta HF não modificou este parâmetro, mesmo sendo diferente do grupo HC. Entretanto, a excreção de proteínas totais não é um perfeito marcador para avaliar o dano glomerular, visto que esta dosagem engloba diversas proteínas de diferentes tamanhos moleculares. O objetivo desta dosagem foi avaliar de forma geral esta análise, contudo no decorrer deste trabalho, será discutido sobre a excreção urinária de albumina, um parâmetro mais fidedigno da alteração na barreira de filtração glomerular.

Os mecanismos da correlação entre obesidade, hipertensão e inflamação ainda não foram completamente elucidados. Entretanto, trabalhos confirmam que a dieta hiperlipídica é capaz de gerar um quadro hipertensivo, com disfunção endotelial, estresse oxidativo e inflamação em ratos que a consumiram por nove semanas (ELMARAKBY; IMIG, 2010).

Em trabalho de DEJI *et al.* (2009), com a utilização de camundongos C57BL/6 que consumiram dieta hiperlipídica por 12 semanas, os autores encontraram parâmetros clássicos de instalação da síndrome metabólica. Ainda, o grupo HF apresentou atraso na excreção urinária de sódio após uma infusão aguda de sal e elevação da pressão arterial sistólica sensível ao sal. Além disso, a expressão renal dos RNA mensageiros de renina, da enzima conversora de angiotensinogênio e do angiotensinogênio aumentaram comparado aos animais considerados magros, sugerindo uma ativação do sistema renina-angiotensina pela dieta hiperlipídica. A ativação renal do sistema renina-angiotensina é associada com alteração do manejo de sódio nos rins, o que juntos é um dos mecanismos de injúria renal e hipertensão em modelos animais com dieta hiperlipídica (DEJI *et al.*, 2009; ZOCCALI, 2009).

Em nosso trabalho, foi encontrado que o grupo HF apresentou redução da fração de excreção renal de sódio em relação ao grupo com ração padrão (TABELA 10). Essa redução pode ser devida ao mecanismo explorado acima, mas como não foi analisada

a pressão arterial desses animais, não podemos confirmar essa hipótese. Entretanto, não foram encontradas diferenças nas concentrações plasmáticas de sódio entre os grupos analisados, o que pode ser indicativo de que o volume circulatório efetivo esteja aumentado, para realizar efeito diluidor. Ainda, a carga excretada de sódio por unidade de tempo não sofreu modificações entre as dietas modificadas, exceto no caso dos grupos suplementados com óleo de girassol (HFOG e HCOG) que apresentaram reduções neste parâmetro em relação ao grupo SOG.

Em modelo animal de hipertensão, ratos Dahl sensíveis ao sal, DIAZ ENCARNACION e colaboradores (2008) encontraram que o óleo de peixe adicionado na ração e consumido por 28 dias foi capaz de reduzir a pressão arterial e amenizar a injúria renal via inibição da ERK. Além disso, foram considerados os efeitos vasodilatadores dos ácidos graxos EPA e DHA, constituintes do OP, que podem ter atuado via mecanismos independentes de óxido nítrico que envolva liberação de cálcio intracelular. No nosso estudo, o OP incrementou a FE_{Na+} nos grupos que ingeriram a hiperlipídica ou ração rica em carboidrato, entretanto o dado não foi estatisticamente diferente.

O K^+ constitui o principal cátion intracelular e o controle do seu balanço é fundamental para a sobrevivência do indivíduo. Reduções drásticas nas concentrações plasmáticas de potássio, principalmente pelo uso de diuréticos, são associadas com aumento da mortalidade via doenças cardíacas (COSTELLO-BOERRIGTER *et al.*, 2006). As concentrações plasmáticas deste cátion foram analisadas neste estudo e foi verificado que de uma forma geral o modelo de indução de obesidade, tanto pela dieta HF, quanto pela HC não modificaram este parâmetro. Já em relação à carga excretada de potássio, é possível perceber que as dietas HF e HC reduziram sua excreção nos grupos com e sem suplementação, exceto no grupo HCOP que não apresentou redução compatível aos grupos com mesma dieta. Esta redução pode ser resultado de um incremento na reabsorção pelo túbulo proximal ou uma redução na secreção deste íon nos segmentos distais.

O *clearance* de lítio (C_{Li}) foi realizado com a finalidade de estimar o transporte de sódio no túbulo proximal e o aporte deste íon aos segmentos distais do néfron. Este método se fundamenta na evidência de que a absorção de lítio no túbulo proximal

ocorre na mesma proporção daquela observada para sódio e água, e de que virtualmente nenhum lítio é reabsorvido nos segmentos distais. Desta forma, o *clearance* de lítio é indicativo da reabsorção de sódio nos túbulos proximais. A partir dos valores de *Clearance* de lítio e das concentrações plasmáticas de Na^+ é possível também calcular outros parâmetros, como a razão *clearance* de sódio / *clearance* de lítio ($C_{\text{Na}^+}/C_{\text{Li}}$) em porcentagem, denominado também de excreção pós-proximal fracional de sódio, que permite estimar a reabsorção de sódio no néfron distal (BAK; THOMSEN, 2004; BOER *et al.*, 2005).

O modelo de obesidade, como já comentado anteriormente, pode gerar quadros com alterações físicas renais, como a compressão medular, aumentar a atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona e da atividade simpática, que culminam em estímulo para reabsorção tubular renal de sal. Sendo assim, temos que a fração de excreção de sódio foi reduzida com as dietas modificadas, dado já discutido anteriormente (TABELA 10), e associado a este fato, o *clearance* de lítio, que estima o transporte de sódio nos túbulos proximais, apresentou reduções na ordem de 37 e 50% entre os grupos HC e HF, respectivamente, em relação ao grupo S (dado não diferente estatisticamente), representando possivelmente um aumento da reabsorção de sódio nos segmentos proximais do néfron em relação ao grupo com dieta padrão (TABELA 11).

Já os valores da excreção pós-proximal fracional de sódio seguem o mesmo perfil comentado pelo *clearance* de lítio, com as dietas modificadas apresentando valores aproximadamente 70% menores em relação à dieta padrão. Isto sugere um incremento na reabsorção de sódio por parte do néfron distal dos animais obesos. Mesmo as análises de manejo tubular de sódio não apresentando diferenças estatísticas é possível perceber que as dietas ricas em carboidratos e em lipídeos, no modelo proposto, são capazes de alterar, mesmo de forma inicial este parâmetro. No entanto, há possibilidade de que a utilização das mesmas dietas por tempos mais prolongados seja necessária para confirmação dos dados acima relacionados. Além disso, a aferição da pressão arterial dos animais seria imprescindível para qualquer suposição realizada pelas alterações induzidas pelas dietas propostas.

Os rins apresentam papel dominante na regulação da composição e do volume

do fluído extracelular, normalmente mantendo um ambiente interno estável pela excreção de quantidades apropriadas de água e solutos pela urina. Estas substâncias incluem não somente produtos finais de metabolismo, mas incluem substâncias utilizáveis, mas presentes em excesso pela alimentação e metabolismo (TANNER, 2009).

Diversos mecanismos estão envolvidos com a regulação da composição e do volume dos fluídos corporais, entre estes, tem sido relacionado o papel da ativação da proteína AMPK em casos de hipo- e hiperosmolalidade. Com o aumento da ingestão de sal pela dieta, há a ativação das proteínas ERK1/2 e da subunidade p38 da MAPK e ativação assim da AMPK. Ainda não é completamente elucidado o papel renal da AMPK sobre a osmolalidade, mas participa no controle de liberação de óxido nítrico das células da mácula densa, o qual estimula a liberação de cálcio intracelular que está aumentado em casos de carga de sal elevada (FRASER *et al.*, 2005).

Curiosamente, a expressão protéica de AMPK no grupo que recebeu dieta rica em carboidrato (HC) foi 12% menor em relação ao grupo com dieta padrão (S), fato discutido posteriormente, e apresentou redução de 10% na osmolalidade plasmática e de 50% na osmolalidade urinária em comparação com o mesmo grupo (TABELA 12). A alteração na osmolalidade plasmática não pode ser explicada pela concentração plasmática de sódio ou potássio, visto que não houve alteração nestes parâmetros. No caso da osmolalidade urinária, reduziu-se em aproximadamente 80% no grupo HC em relação ao S e houve redução de 64% e 14% na carga excretada de sódio e na fração de excreção de sódio, respectivamente, no mesmo grupo em relação ao S, entretanto, não houve diferença estatística nestes dois últimos dados.

Em relação ao grupo com dieta hiperlipídica, houve redução em 40% na osmolalidade urinária em relação ao grupo S. Da mesma forma ocorrida no grupo HC, o HF apresentou redução na fração de excreção de sódio em 55% e na carga excretada de sódio em 65% (dado não diferente estatisticamente).

Nos grupos que receberam suplementações com óleo de peixe é possível perceber somente o papel das dietas modificadas, sendo que não houve modificações geradas somente pelo óleo de peixe. A osmolalidade plasmática e urinária apresentaram-se reduzidas no grupo HCOP em 5 e 59%, respectivamente em

comparação com o SOP e o grupo HFOP aumentou a osmolalidade urinária em relação ao HCOP, não apresentando a redução encontrada pelo seu grupo sem suplementação (HF). Sendo assim, nos dois grupos com dietas modificadas há alterações no transporte tubular de eletrólitos e na regulação da composição e do volume dos fluídos corporais, sendo que as suplementações não apresentaram papel nestes parâmetros.

Os valores de osmolalidade urinária e *clearance* de H₂O livre são indicativos de níveis adequados de ADH e de uma correta reabsorção de água pelos segmentos distais do néfron. Ainda na TABELA 12, as dietas modificadas HC e HF apresentaram aumentos nos valores do *clearance* de água livre, tornando-os mais próximos de valores positivos, em 90 e 94%, respectivamente, em relação ao grupo S. O mesmo ocorre nos grupos suplementados com OP, onde houve aumentos de 93 e 66% nos grupos HCOP e HFOP, respectivamente, em comparação ao grupo SOP. Isto indica uma menor reabsorção de água ao longo do ducto coletor dos animais obesos.

Já no caso das dietas modificadas e suplementadas com óleo de girassol, estes apresentaram não só aumentos no *clearance* de água livre, mas esse aumento gerou valores positivos deste parâmetro, representando alterações na reabsorção de água nestes grupos. É visto que alguns dos parâmetros de resistência à insulina, como insulina plasmática e teste de tolerância intraperitoneal à glicose, além de aumento de peso corporal, foram expressivos nos grupos suplementados com óleo de girassol, o que pode ter contribuído para alterações no manejo de água, pela compressão renal ou outras alterações que possam contribuir para a injúria renal.

Outro parâmetro que foi afetado pelo consumo das dietas ricas em carboidratos ou em lipídeos foi o fluxo urinário (TABELA 12). Os grupos HC e HF sofreram redução deste parâmetro em 66 e 73%, respectivamente, em relação ao S. Nos grupos suplementados com OP, o grupo HFOP reduziu em 60% o fluxo urinário em relação ao SOP. Essas reduções foram compatíveis com a queda da filtração glomerular encontradas nestes grupos, que possivelmente ocorre pelo acúmulo de tecido adiposo visceral gerando aumento da pressão da veia renal, reduzindo a perfusão tecidual (WAHBA; MAK, 2007). Já a suplementação com OG (HFOG) gerou aumento de 4,7 vezes a média do fluxo urinário comparando-se com o grupo HF, valor compatível com a osmolalidade urinária mais baixa encontrada neste grupo.

Os ácidos graxos da família n-6, presentes no óleo de girassol, apresentam papéis fundamentais na fisiologia renal normal, especialmente na hemodinâmica renal. Entretanto, quando analisamos as modificações encontradas pelo papel da suplementação com OG verificamos que este alterou os parâmetros da parte metabólica do trabalho, não tendo alterado os parâmetros da função renal, até agora discutidos. Não se discute o fato que os parâmetros metabólicos são, por si só, importantes para o entendimento do modelo e dos objetivos propostos, entretanto, visando o maior aprofundamento das alterações provocadas pelas dietas e pelo óleo de peixe, novas metodologias foram sendo investigadas ao longo do trabalho, ficando inviável a utilização de nove grupos experimentais em suas análises. Sendo assim, os grupos com suplementação com óleo de girassol não foram utilizados nas análises das metodologias discutidas a partir deste momento, permanecendo somente o OP, como suplementação estudada.

6.2.2.1 Prostanóides, Citocinas e Excreção urinária de albumina

A hemodinâmica renal é, principalmente, regulada por prostanóides derivados de ácidos graxos. Os mais comumente encontrados são a prostaglandina E_2 (PGE_2) e o tromboxano A_2 (TXA_2), apresentando funções de regulação do tônus vascular, da filtração glomerular, secreção de renina e transporte tubular de sal e água. Estes prostanóides são produzidos pelo tecido renal e apresentam receptores acoplados à proteína G, expressos principalmente em podócitos e no mesângio (MAKINO *et al.*, 2002). Todavia, diversos trabalhos já relacionam estes prostanóides e sua enzima conversora, a COX-2, como sendo peças-chaves na disfunção vascular e na inflamação renal induzidos pela obesidade (STITT-CAVANAGH; MACLEOD; KENNEDY, 2009).

Assim, para melhor entendimento dos fatores que poderiam estar modulando a filtração glomerular, já discutida anteriormente, e outros fatores relacionados com inflamação do tecido renal, a dosagem da excreção urinária de PGE_2 e TXA_2 tornou-se importante. Entretanto, o TXA_2 apresenta um ciclo de meia-vida de aproximadamente

de 30 segundos e é rapidamente hidrolisado em um composto mais estável, porém inativo biologicamente, o tromboxano B₂. Sendo assim, como a dosagem de TXB₂ é aceita como indicador da produção de TXA₂, a análise realizada neste trabalho foi a da excreção urinária de PGE₂ e TXB₂ (McCANN; TOKARSKY; SORKIN, 1981).

Tanto o gráfico representativo da excreção de PGE₂, quanto a de TXB₂ estão representados na FIGURA 11. No modelo experimental proposto, as dietas hiperlipídica e rica em carboidratos reduziram a excreção urinária de TXB₂, sem alterar a excreção de PGE₂ em relação ao grupo com ração padrão. Nos grupos suplementados, a excreção de TXB₂ reduziu-se, mais pelo papel das dietas HC e HF do que propriamente por ação do OP.

Em trabalho do nosso grupo de pesquisa, a suplementação com OP reduziu a excreção urinária de TXB₂, sem afetar a excreção de PGE₂ em ratos *Wistar* saudáveis e portadores de tumor de Walker 256, entretanto a duração da suplementação neste caso era de 70 dias (COELHO *et al.*, 2012). Há possibilidade dos ácidos graxos n-3, EPA e DHA, presentes na suplementação com OP serem requeridos na formação de outros metabólitos celulares, como produção de lipoxinas, resolvinas e protectinas, ou ainda atuando diretamente como sinalizador celular, não modificando a via de produção de prostanóides (BÖRGESON; SHARMA, 2013).

A obesidade não pode ser resumida ao fato de deposição de gordura por consequência de um desbalanço entre energia derivada da ingesta alimentar e a energia gasta nas atividades diárias. A obesidade é, de fato, uma doença multifatorial onde o excesso de tecido adiposo age como órgão endócrino e exócrino com efeitos neuro-humorais e vasoativos que estão associados com a gênese de danos em tecidos como o rim. Fatores como angiotensinogênio e renina, citocinas produzidas pelo tecido adiposo, fatores de crescimento e adipocinas bioativas são implicados ou relacionados com a injúria renal (EKNOYAN, 2011).

O quadro inflamatório gerado pela obesidade apresenta-se como fator de desenvolvimento da resistência à insulina, inflamação sistêmica, hipertensão e doença crônica renal via aumento de citocinas e adipocinas inflamatórias. Citocinas produzidas pelo tecido adiposo na obesidade, como TNF- α e MCP-1 tem sido associados com a progressão da disfunção vascular e inflamação, onde a disfunção endotelial precede a

injúria renal (PRAGA; MORALES, 2006; ELMARAKBY; IMIG, 2010).

O TNF- α , que é sintetizado principalmente por macrófagos no tecido adiposo, modula a sensibilidade à insulina por diversos mecanismos como a inativação do receptor de insulina ou do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1), lipólise e lipogênese. Reduções na secreção de TNF- α estimulam a secreção de adiponectina, um sensibilizador da insulina. Além disso, o TNF- α medeia a inflamação na glomerulonefrite, na falência renal aguda por endotoxemia e na fibrose renal (GIUGLIANO; CERIELLO; ESPOSITO, 2006; ZOCCALI, 2009).

O perfil de adipocinas na obesidade é modificado, apresentando redução na secreção de adiponectina pelos adipócitos. A adiponectina é secretada para a circulação e apresenta efeito anti-inflamatório, antiaterogênico e sensibilizador à insulina, contribuindo para inibição da resistência à insulina, da inflamação e do estresse oxidativo. A hipoadiponectinemia tem sido associada à disfunção endotelial em pacientes com doença cardíaca. Além disso, recentemente a adiponectina está sendo relacionada na patogênese da doença renal em indivíduos obesos, por efeitos de proteção sobre os podócitos, reduzindo a incidência de proteinúria, via ativação da enzima adenosina monofosfato cinase (AMPK) (GIUGLIANO; CERIELLO; ESPOSITO, 2006; ZOCCALI, 2009; DECLÈVES *et al.*, 2011; KACSO *et al.*, 2012).

Para tentar elucidar parte do processo de inflamação gerada pela dieta hiperlipídica, principalmente, foram realizadas dosagem plasmática de TNF- α e adiponectina (FIGURA 12) e de TNF- α no tecido renal (FIGURA 13). As dietas HF e HC não afetaram as concentrações plasmáticas TNF- α e adiponectina. Visto que a secreção de adiponectina é estimulada pela inibição da secreção de TNF- α , este não foi modificado e não alterou a secreção de adiponectina. Estudo de DECLÈVES *et al.*, 2011, com camundongos C57BL/6J, verificou que as concentrações de adiponectina foram reduzidas nos mesmos pelo consumo por 1 semana de dieta hiperlipídica. Entretanto, foi percebido que esta redução pode ter ocorrido no início pelo aumento da gordura corporal e após 12 semanas com a mesma dieta, as concentrações de adiponectina voltaram ao normal, apresentando uma secreção compensatória.

Mesmo não havendo aumento significativo na concentração plasmática de TNF- α e redução na concentração de adiponectina, quadro característico da obesidade, a

suplementação com óleo de peixe foi capaz de reduzir a concentração de TNF- α e elevar a de adiponectina nos animais que receberam ração hiperlipídica, apresentando um efeito anti-inflamatório e auxiliando no quadro de resistência à insulina, fato encontrado por outros trabalhos sobre os potenciais efeitos da família de ácidos graxos n-3 em modelos de obesidade (GIUGLIANO; CERIELLO; ESPOSITO, 2006; KALUPAHANA *et al.*, 2010).

Já a concentração de TNF- α no tecido renal foi aumentada pela dieta HF, podendo estar relacionada com o grau de inflamação do tecido. O grupo HCOP apresentou aumento deste mesmo parâmetro em relação ao grupo SOP, verificando mais o papel da dieta HC, do que propriamente a ação do OP, visto que não houve diferença entre HCOP e HC. Como no caso da concentração de TNF- α no plasma, o OP no grupo HF também foi capaz de reduzir, e neste caso em 60%, a concentração desta citocina no tecido renal em relação ao grupo HF, apresentando um efeito renoprotetor.

Em trabalho de TAYYEBI-KHOSROSHAHI e colaboradores (2012), com pacientes com doença renal de estágio final, a suplementação com OP na dose de 3g/dia por 2 meses foi capaz de reduzir as concentrações plasmáticas de TNF- α , citocina que se apresenta elevada em pacientes que apresentam doença inflamatória e dialisados.

A habilidade dos ácidos graxos limitarem a inflamação tem sido demonstrada por diversos estudos em modelos animais e em humanos com uso de diferentes doses de n-3. Estão associados com redução na concentração de eicosanóides pró-inflamatórios, citocinas, quimocinas e outros biomarcadores inflamatórios. Entretanto, ainda não foi definida uma recomendação adequada de OP, ou outra fonte de n-3, para as diversas doenças em que os AGPI n-3 apresentam efeitos benéficos (RANGEL-HUERTA *et al.*, 2012).

Na obesidade, o desenvolvimento da injúria na barreira glomerular apresenta como fatores causais a hiperglicemia gerando produtos finais de glicação avançada, redução da adiponectina, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e ativação de proteínas ligadas à apoptose e separação entre os podócitos, podendo gerar o espaçamento ou a morte

das células da barreira glomerular (STITT-CAVANAGH; MACLEOD; KENNEDY, 2009; EKNOYAN, 2011).

A presença de proteínas na urina, com predominância para albumina (67kDa), indica alteração na barreira de filtração glomerular e há forte correlação entre a concentração de albumina excretada e a progressão da doença renal de estágio final. Além de ser considerada como indicador de dano glomerular ou, ainda, preditor de doença renal crônica, a albuminúria pode ser um efeito causativo dessas enfermidades. Concentrações elevadas de albumina suprimem a capacidade metabólica dos túbulos renais, promovendo inflamação e levando a fibrose tubulointersticial e subsequente redução da taxa de filtração glomerular (EJERBLAD *et al.*, 2006; STITT-CAVANAGH; MACLEOD; KENNEDY, 2009).

Em indivíduos com diabetes tipo 2 que desenvolvem nefropatia avançada foi encontrado que a concentração plasmática de adiponectina, neste caso, é um importante preditor da proteinúria. Baixas concentrações de adiponectina apresentaram relação com o aumento da excreção urinária de albumina (KACSO *et al.*, 2012). O mesmo quadro foi encontrado em pacientes obesos, onde a albuminúria apresentou correlação negativa com a concentração plasmática de adiponectina nestes pacientes (SHARMA *et al.*, 2008).

Além da importância protetora da adiponectina sobre os podócitos e, conseqüentemente, atenuando a proteinúria, fato já comentado, outros fatores podem estar atuando na injúria renal pela obesidade. Durante a indução da obesidade, o aumento do metabolismo lipídico sistêmico pelo acúmulo de tecido adiposo e elevação de ácidos graxos livres geram um quadro já citado de “lipotoxicidade”, situação relacionada com o mecanismo de indução da síndrome metabólica. Além disso, é proposto que a alteração de metabolismo lipídico local no rim pode ser importante na patogênese da injúria renal na síndrome metabólica. Ainda, tem se reportado que há possibilidade de acúmulo de gordura no tecido renal, que geraria glomérulosclerose, fibrose intersticial e albuminúria (DEJI *et al.* 2009).

Corroborando com a literatura, a maior excreção de albumina normalizada pela concentração urinária de creatinina encontrada neste trabalho foi no grupo HF, ou seja, os animais obesos apresentaram uma maior excreção de albumina na urina em relação

aos animais com dieta *standard*. Neste caso, o OP reduziu em 40% esta excreção em relação ao grupo HF, mas não apresentou diferença significativa ($p=0,08$) (FIGURA 14). Há a possibilidade da redução na excreção de albumina ter sido discreta visto que as concentrações de adiponectina neste grupo foram aumentadas, mas não em valores muito acima do grupo HF. Ou ainda, que o acúmulo de gordura no rim tenha sido mais intenso neste grupo, principalmente relacionando com o ganho de peso e de tecidos adiposos, dados já mostrados, e as alterações positivas geradas pelo OP, como redução do TNF- α e aumento da adiponectina plasmáticos e, ainda, TNF- α no tecido renal, não tenham sido suficientes para reduzir ainda mais a proteinúria no grupo HFOP. Assim, outros marcadores podem ser investigados para avaliar os mecanismos envolvidos na proteinúria em indivíduos obesos e os potenciais efeitos do OP sobre este modelo.

6.2.2.2 Alterações morfofisiológicas do tecido renal

Frequentemente tem se associado a obesidade ao diabetes tipo 2, e obviamente que não se discute que a fisiopatologia de cada uma dessas enfermidades é capaz de gerar a outra, entretanto as lesões renais geradas pela obesidade podem ser distintas das formadas pela nefropatia diabética. Isso porque, na nefropatia diabética temos que a hiperglicemia e os produtos finais de glicação avançada (AGE - *advanced glycation end products*) oriundos desta hiperglicemia, que atuam via proteína ERK na proliferação de miofibroblastos induzem uma fibrose tecidual. Já a obesidade apresenta como fatores de injúria renal a hiperlipidemia, hiperglicemia, hipertensão, citocinas pró-inflamatórias entre outros fatores. Entretanto, tanto na obesidade, quanto na nefropatia diabética, o tecido renal sofre por modificações em sua morfologia e funcionalidade que podem gerar glomeruloesclerose, perda de néfrons funcionais e desenvolvimento de fibrose intersticial que culminam em doença renal crônica (LI *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2006; EKNOYAN, 2011).

A fibrose tubulointersticial renal é caracterizada por aumento do número de

miofibroblastos intersticiais que medeia a deposição excessiva de componentes de matriz e que levam à inflamação crônica, injúria e fibrose tubulointersticial. Ainda, a formação de miofibroblastos é o mecanismo chave no desenvolvimento da fibrose tubulointersticial e tem sido o maior determinante na progressão da glomerulonefrite, incluindo na nefropatia diabética. Os miofibroblastos podem ser derivados das células tubulares epiteliais, o que é caracterizado como transição epitelial-mesenquimal (TEM), comum em doenças renais crônicas em humanos e em modelos experimentais (LI *et al.*, 2004; SIMONSON, 2007; ZEISBERG; NIEILSON, 2009; HONG; LU, 2013).

Tem sido proposto que a TEM apresenta papel importante no desenvolvimento da doença renal crônica. A transição epitelial-mesenquimal é caracterizada pela perda de proteínas de citoesqueleto, como a E-caderina, de complexos juncionais e redução da expressão de citoqueratina. Associadas às estas perdas, essas células começam a adquirir um fenótipo mesenquimal, com a expressão de α -actina de musculatura lisa (α -*smooth muscle actin* - SMA) e vimentina, acompanhada da dissolução da membrana basal por metaloproteases de matriz 2 ou 9 e invasão ou migração ao espaço intersticial. Além disso, a TEM é estimulada por citocinas como TNF- α , IL-6 e, especialmente o fator de crescimento transformador- β 1 (TGF- β 1), produzidas tanto pelo tecido lesado, quanto por leucócitos quimioatraídos e infiltrados no tecido renal (LI *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2006; SIMONSON, 2007).

Um modelo de nefropatia diabética espontânea é a utilização de ratos que apresentam uma mutação recessiva no gene do receptor de leptina (*fa-gene*), os ratos *Zucker*, o que resulta em hiperfagia, obesidade, hiperlipidemia, hiperglicemia, resistência à insulina e hiperinsulinemia (VELASQUEZ; KIMMEL; MICHAELIS, 1990). Visto o quadro gerado por essa mutação, o trabalho de COIMBRA *et al.* (2000) encontrou que com 18 semanas de vida os animais desenvolvem espontaneamente glomeruloesclerose focal e segmental e com 40 semanas, proteinúria, quadro que ao longo do tempo pode, gerar falência renal. Outras alterações foram encontradas pela utilização de marcadores morfológicos do tecido renal, como aumento da infiltração glomerular de monócitos/macrófagos e da expressão de desmina nos podócitos com 6 semanas de vida, sendo que essas alterações se agravam com aumento da expressão de desmina nos podócitos com 18 semanas e de infiltração de monócitos/macrófagos

com 14 semanas de vida. Ainda, houve aumento da expressão de vimentina, o que demonstra dano nas células tubulares, e ativação de células mesangiais, pelo aumento da expressão de α -SMA.

Mesmo que haja diferenças entre as modificações geradas pela obesidade e pelo diabetes tipo 2, as informações a respeito dessas alterações são de profunda importância, visto que nos dois casos a injúria no tecido renal pode ser formada. Interessantemente, são poucos os estudos utilizando marcadores de alterações morfofuncionais no tecido renal utilizando o modelo de obesidade por dieta hiperlipídica e sobre a participação do óleo de peixe nessas modificações. Sendo assim, foi proposta neste trabalho a investigação das possíveis modificações que possam ocorrer no tecido renal pelo consumo de dieta hiperlipídica ou rica em carboidrato.

Como comentado anteriormente, em condições normais a expressão de α -SMA é mais intensa no glomérulo e capilares peritubulares durante o desenvolvimento inicial pós-natal renal e restrita à parede de arteríolas e de artérias quando a maturação destas estruturas está completa (BALBI *et al.*, 2008). Como já descrito na metodologia, sua análise foi realizada por método semiquantitativo (*score*) e foram analisados 50 campos e 50 glomérulos por camundongos.

Como representado na FIGURA 15A e 15B, a marcação de α -SMA nos glomérulos e por campo tubulointersticial não foi modificada pela dieta hiperlipídica. Entretanto, na marcação glomerular de α -SMA, o grupo com ração rica em carboidrato apresentou aumento deste parâmetro, elevando a marcação do grupo HCOP vs SOP, aumento este mais relacionado com o papel da dieta HC do que propriamente dito da suplementação com OP, visto que nos grupos SOP e HFOP, a suplementação de OP foi capaz de reduzir a marcação de α -SMA pelo grupo HFOP (vs HCOP) nos glomérulos e tanto o SOP, quanto o HFOP reduziram este parâmetro na marcação tubulointersticial, sendo diferentes significativamente em relação seus respectivos controles sem suplementação, S e HF, respectivamente. Visto que há uma grande correlação entre a expressão tubular de α -SMA e a fibrose intersticial, acúmulo de miofibroblastos intersticiais, deposição de colágeno I e III, expressão tubular de TGF- β 1 e por fim disfunção renal, há fortes indícios que o OP pode apresentar algum papel em suprimir o processo de transição epitelial-mesenquimal no tecido renal, mesmo que este

não tendo sido completamente instalado pela dieta HF (JINDE *et al.*, 2001).

Como comentado anteriormente, juntamente com a α -SMA, a vimentina é considerado um marcador para caracterizar a transição epitelial-mesenquimal das células tubulares renais (CHENG *et al.*, 2006). Neste estudo, somente a dieta rica em carboidrato modificou a marcação para α -SMA, entretanto, o número de células intersticiais positivas para vimentina aumentou nos grupos que receberam dieta rica em carboidrato e rica em lipídeos, apresentando diferenças entre seus respectivos grupos que consumiram ração *standard* (HF e HC vs S; HCOP vs SOP) (FIGURA 16A). Já na marcação de células tubulares positivas por campo, mostrada na FIGURA 16B, somente o grupos HF apresentou elevação deste parâmetro, sendo revertido à condição normal pelo OP, novamente apresentando um papel renoprotetor.

Processos de fibrose durante a progressão da doença renal crônica, como glomeruloesclerose e fibrose tubulointersticial, estão frequentemente presentes. Após uma injúria renal, o rim pode passar por processos de crescimento compensatório associado com hipertrofia celular e hiperplasia induzido em parte pela infiltração de células como linfócitos e monócitos. Ao longo do tempo, esses processos geram danos nas células glomerulares e tubulares, e podem gerar apoptose. A apoptose dessas células estimula resposta proliferativa compensatória a fim de manter a integridade estrutural renal, e um dos marcadores desse processo é o PCNA, que tem sua maior expressão em locais de alta taxa de apoptose renal (THOMAS *et al.*, 1998; HONG; LU, 2013).

Em estudo com cachorros que receberam dieta hiperlipídica, HENEGAR e colaboradores (2001) verificaram que o consumo de dieta HF após 7, 9 ou 24 semanas foi capaz de gerar expansão na cápsula de Bowman, aumentar a proliferação celular no glomérulo, pelo aumento de células positivas para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA - *proliferation cell nuclear antigen*), e aumentar o espaçamento da matriz mesangial e na membrana basal da cápsula de Bowman, relacionando essas alterações ao aumento da expressão glomerular de TGF- β .

Entretanto, nossos achados não corroboraram estudo de HENEGAR *et al.* (2001), onde o consumo de ração HF por 12 semanas, neste trabalho, não foi capaz de gerar aumento na proliferação de células nos glomérulos ou nos túbulos e interstício

pela marcação de PCNA, em camundongos Swiss. Todavia, a dieta rica em carboidratos aumentou o número de células tubulares e intersticiais positivas para PCNA em relação à dieta padrão. Essa alteração foi acompanhada pelo grupo HCOP, onde a suplementação de OP não suprimiu esta alteração (FIGURA 17).

Durante o desenvolvimento da obesidade, a hipertensão aparece como sendo um dos fatores que mais contribuem para a injúria renal. Em estudo de DIAZ ENCARNACION *et al.* (2008), utilizando modelo de ratos hipertensos sensíveis ao sal, verificou que o consumo de dieta suplementada com OP foi capaz de gerar redução na pressão arterial, da excreção urinária de proteínas e de marcadores histopatológicos de injúria renal, como redução da expressão de α -SMA nos túbulos e de PCNA do homogenato cortical renal e da infiltração renal de monócitos/macrófagos, pela redução de células positivas para ED-1. Além disso, os efeitos antiproliferativos e de redução da fibrose intersticial gerados pelo OP foi fortemente associado com a inibição da atividade da proteína proliferativa ERK.

Associada ainda com maior expressão de PCNA, temos que a expressão glomerular de desmina representa que estas células estão expressando uma proteína de citoesqueleto normalmente não encontrada nesta região, podendo ser relacionado com proliferação de células com características distintas às encontradas normalmente nos glomérulos (COIMBRA *et al.*, 2000). Neste trabalho, a imunomarcação para desmina seguiu o mesmo protocolo de análise descrito para marcação de α -SMA, realizado por *score* de marcação, neste caso realizado a cada glomérulo encontrado. Como mostrado na FIGURA 18, a maior expressão de desmina foi encontrada no grupo com dieta hiperlipídica e suplementação com óleo de peixe em relação ao grupo com mesma suplementação e dieta padrão, representando o papel da dieta hiperlipídica neste marcador. Mesmo o OP atuando na redução da proteinúria e na expressão de α -SMA, estes efeitos não aparecem ter relação na expressão de desmina, visto que este parâmetro não foi afetado positivamente pela suplementação com OP.

Em modelo de nefrotoxicidade induzida por cisplatina, FRANCESCATO e colaboradores (2007) encontraram que a maior expressão de pJNK no tecido renal está fortemente relacionado com a inflamação e apoptose celular, visto que utilizando um inibidor seletivo de fosforilação de JNK (c-jun cinase N-terminal - *c-jun N-terminal*

kinase) (SP600125) houve redução de células em apoptose e restrição da inflamação, com menor número de células positivas para ED-1, ou seja, menor infiltração de monócitos/macrófagos no tecido lesado.

A JNK faz parte da família das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK – *mitogen activated protein kinase*) e também do grupo de proteínas cinases ativadas por estresse juntamente com a subunidade p38 da MAPK. Este grupo de cinases ativadas por estresse apresenta papel essencial na modulação celular em resposta a estresses variados via modulação de fatores funcionais que regulam diferenciação, proliferação, apoptose e fibrose tecidual. Os estímulos para ativação da p38 e da JNK seriam, por exemplo: resposta inata do sistema imunitário, espécies reativas de oxigênio, estresse osmótico, hiperglicemia e irradiação ultravioleta (MA; LIU; NIKOLIC-PATERSON, 2009).

Para tentar investigar se a proteína pJNK estaria envolvida no processo de injúria renal induzida pela obesidade, a imunomarcagem de pJNK foi realizada e está demonstrada na FIGURA 19. As células positivas para pJNK por glomérulo analisado não aumentaram significativamente pela dieta hiperlipídica ou pela dieta rica em carboidrato, embora no grupo HFOP, a suplementação com OP foi capaz de reduzir em 70% o número de células positivas para pJNK em comparação com o grupo HF, tornando o resultado semelhante ao valores encontrados no grupo SOP. Em relação à marcação de pJNK nas células tubulointersticiais, não houve diferenças entre os grupos estudados.

Diversos fatores podem causar estresse tecidual e gerar ativação de JNK. Entre estes fatores temos endotoxinas, espécies reativas de oxigênio, citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF- α , quimocinas, como o MCP-1, fatores de crescimento, entre outros, induzem a uma cascata de reações de fosforilação envolvendo cinases citoplasmáticas específicas que levam à fosforilação e ativação de JNK. Considerando o fato que as concentrações de TNF- α no plasma e no tecido renal apresentaram reduções pelo OP, no grupo HFOP, e a adiponectina, uma adipocina com papel anti-inflamatório, estar elevada neste grupo, haveria a possibilidade da redução de células positivas para pJNK estar relacionada com a redução de TNF- α e aumento de adiponectina, visto que seriam um dos fatores envolvidos com sua ativação. Logo, visto

que é uma proteína de estresse, poderia estar envolvida com a menor marcação para α -SMA nos glomérulos e ainda, não permitindo o aumento da excreção urinária de albumina pela dieta HF, conduzindo a um efeito anti-inflamatório, já conhecido, e renoprotetor do OP (IKEZUMI *et al.*, 2004; SHARMA *et al.*, 2008; DIAZ ENCARNACION *et al.*, 2011)

6.2.2.3 Expressão protéica de AMPK- α 1, COX-2 e subunidade p65 do NF- κ B no tecido renal

Em trabalho já citado de DECLÈVES e colaboradores (2011), utilizando camundongos C57BL/6J, foi verificada a relação direta entre a expressão e ativação da AMPK (adenosina monofosfato cinase) e o desenvolvimento da doença renal induzida por dieta hiperlipídica. Com 12 semanas de consumo de dieta HF, a expressão de AMPK foi reduzida e demonstrou-se aumento de marcadores de fibrose e inflamação. Ao administrar um ativador da AMPK no grupo que recebeu dieta HF por 1 semana, este não apresentou ganho de peso e reduziu a hipertrofia renal, a excreção urinária de peróxido de hidrogênio e de MCP-1 urinário e renal.

A AMPK é uma enzima considerada o maior sensor de energia nos eucariotos e se apresenta reduzida em diversos tecidos, incluindo o rim após consumo de dieta rica em lipídeos. Como já discutido, a adiponectina atua com efeitos protetores via ativação da AMPK, além disso, já foi mostrado que a administração do ativador da AMPK pode gerar aumentos na produção e secreção de adiponectina. Um importante fator da redução da AMPK no tecido renal é a ativação e secreção do MCP-1. A fonte e o mecanismo de produção e liberação do MCP-1 pela dieta hiperlipídica ainda não está completamente elucidado, entretanto, sugere-se que sejam principalmente as células mesangiais e epiteliais do glomérulo que o secretam. O aumento de MCP-1 induz o recrutamento de macrófagos para o tecido, os quais contribuem em maior parte para liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-1 e fatores pró-fibróticos como o TGF- β . Além disso, o MCP-1 pode afetar a mobilidade dos podócitos afetando

sua função com redução de nefrina e subsequente albuminúria (SHARMA *et al.*, 2008; STEINBERG; KEMP, 2009; IX; SHARMA, 2010; DECLÈVES *et al.*, 2011).

Em nosso trabalho, a expressão de AMPK no tecido renal foi reduzida pelo consumo de dieta rica em carboidrato (FIGURA 20). A dieta rica em lipídeos não gerou nenhuma modificação neste parâmetro. Visto que a AMPK é o principal sensor de energia, há possibilidade dos carboidratos derivados da dieta HC atuarem negativamente nesta enzima, podendo ter relação com os marcadores do tecido renal afetados com a dieta HC, como aumento de *score* para α -SMA nos glomérulos e de número de células positivas para vimentina no interstício e para PCNA nas células tubulointersticiais.

Diversas pesquisas relacionam que o OP é capaz de gerar ativação protéica de AMPK induzindo maior produção de adiponectina no tecido adiposo, atuando assim, na sensibilidade à insulina, dislipidemia e inflamação tecidual. Entretanto, não são em todos os tecidos que o OP é capaz de ativar a AMPK, como já investigado em músculo esquelético, fígado e coração. Neste trabalho, não encontramos alteração da expressão protéica da AMPK no tecido renal nos grupos suplementados com OP. Há a possibilidade dos mecanismos protetores encontrados nos grupos com suplementação com OP não serem envolvidos pela cascata de sinalização da AMPK (DOBRZYN *et al.*, 2005; PUGLISI; HASTY; SARASWATHI, 2011).

A obesidade e a hipertensão têm sido investigadas como fatores de risco independentes para o desenvolvimento da disfunção endotelial e doença renal, visto que, modelos experimentais como os ratos obesos Zucker ou os espontaneamente hipertensos, desenvolvem inflamação renal e disfunção endotelial. A associação do consumo de dieta hiperlipídica por 10 semanas com modelo de hipertensão gerou nos animais, além do ganho de peso, resistência à insulina e aumento da concentração plasmática de leptina e de TNF- α , aumento do estresse oxidativo e da inflamação renal, sendo que o principal aumento foi na expressão da enzima COX-2, não modificando a disfunção vascular já encontrada pelo grupo que recebeu dieta hiperlipídica (ELMARAKBY; IMIG, 2010).

A COX-2 é a enzima responsável pela metabolização de ácidos graxos da família n-6 e n-3 para formação de prostanóides. A inibição de COX-2 por fármacos, o que

bloqueia a síntese de prostanóides, reduz a proteinúria em diversos tipos de glomerulopatias. Já foi relatado que o DHA ou o EPA, sozinhos podem reduzir ou ainda inibir a produção de COX-2 atuando via fatores nucleares em cultura de células endoteliais, macrófagos, monócitos e células dendríticas. Os AGPI n-3 reduzem a fosforilação da subunidade I κ B da família NF- κ B, que por si só reduz a ativação da subunidade p65 NF- κ B, já que esta necessita da fosforilação do I κ B para sua liberação e ativação. O NF- κ B induz a expressão gênica de proteínas ligadas à inflamação como a COX-2 (STITT-CAVANAGH; MACLEOD; KENNEDY, 2009; CALDER, 2012).

Em injúrias renais, o OP foi capaz de reduzir a ativação de NF- κ B, inibir a expressão de COX-2 e da ERK, além de diminuir a ativação da NADPH oxidase em ratos hipertensos sensíveis ao sal, reduzindo assim a inflamação renal e diminuindo a resposta proliferativa renal ao insulto (DIAZ ENCARNATION *et al.*, 2008).

No presente estudo foram realizadas análises da expressão de COX-2 e da subunidade p65 do NF- κ B, como mostrado na FIGURA 21 e 22, respectivamente. Entretanto, contrariando a maioria dos estudos, o OP neste modelo experimental não reduziu a expressão de COX-2 ou do NF- κ B. Curiosamente a expressão de COX-2 foi reduzida em 14% pela dieta rica em lipídeos em relação ao grupo que recebeu ração padrão. Já a ração rica em carboidrato não alterou nenhuma das duas expressões protéicas analisadas.

Em modelo animal de doença hepática induzida pelo álcool, o consumo de dieta rica em gordura saturada reduziu a expressão de COX-2 e de TNF- α no fígado dos animais em relação ao consumo de dieta suplementada com óleo de peixe. Essa redução foi relacionada pela redução de ácidos graxos poliinsaturados na dieta, o que poderia evitar sua metabolização e ativação da COX-2 (NANJI *et al.*, 1997). Esta redução na expressão de COX-2 poderia ser extrapolada ao encontrado em nosso trabalho, já que a dieta hiperlipídica apresenta em sua composição grandes quantidades de banha de porco, que contém somente lipídeos saturados, e houve redução na expressão de COX-2 neste grupo.

Os efeitos encontrados do OP sobre as dietas modificadas podem ser relacionados simplesmente à incorporação dos AGPI n-3 na membrana celular. Os ácidos graxos incorporados nos fosfolipídeos de membrana apresentam importantes

papéis na função das proteínas transmembrânicas, na manutenção da fluidez na membrana, na formação dos bolsões lipídicos encontrados na membrana e na modulação de segundos-mensageiros. A presença de AGPI n-3 na dieta faz com que estes sejam incorporados na membrana plasmática das células de todo o organismo, podendo atuar na função celular, alterar diretamente a transcrição gênica ou indiretamente, através de ligações em fatores de transcrição como o PPAR, na produção de eicosanóides e outras moléculas de origem lipídica, como as resolvinas e protectinas, e na sinalização celular como um todo (CALDER, 2012).

Como era de se esperar, no tecido renal, a suplementação com OP foi capaz de reduzir a razão da porcentagem de ácido araquidônico pela concentração de EPA em todas as diferentes dietas em estudo (SOP, HCOP e HFOP). Obviamente que houve diferenças entre as incorporações, como a da concentração de EPA aumentar no grupo HFOP vs HF, mas sem diferença significativa, ou da redução da razão n-6/n-3 neste mesmo grupo, mas também sem diferença estatística. Já a concentração de DHA foi aumentada no grupo SOP (vs S) e a razão n-6/n-3 reduzida no grupo SOP e HCOP (vs S e HC, respectivamente) (TABELA 12). Isso comprova que de uma forma geral, houve incorporação de AGPI n-3 com a suplementação com OP por 4 semanas e que os efeitos encontrados podem ser relacionados com a composição lipídica da membrana plasmática ou pelas ações intracelulares dos AGPI da família n-3.

A dieta rica em carboidrato gerou aumento da concentração de ácido mirístico no tecido renal em relação aos grupos S e HF, fato não acompanhado por seu grupo com suplementação com OP (HCOP). Ainda, as dietas HF e HC apresentaram redução nos valores de ácido linoléico em relação ao grupo de dieta padrão. Este fato é acompanhado pelo grupo HCOP vs SOP e, ainda, os grupos HF e HFOP apresentam aumento da concentração de ácido linoléico em relação aos seus respectivos grupos com dieta rica em carboidrato. Esse resultado é condizente com a formulação das dietas estudadas, sendo que as rações S e HF apresentam maior fonte de ácidos graxos n-6 que a dieta HC, no S é o milho e na HC e HF seria o óleo de soja, sendo que a HF apresenta uma composição deste óleo em valores acima da dieta HC.

Neste trabalho foram avaliadas alterações na função renal causadas pelo consumo de dieta rica em carboidrato e em lipídeos e o papel possivelmente protetor da

suplementação, por quatro semanas, do óleo de peixe sobre estes parâmetros. No período de oito semanas de indução do modelo experimental, a dieta rica em lipídeos foi capaz de gerar de forma mais eficaz um quadro de obesidade que a dieta rica em carboidrato.

Após o período de indução e de suplementação com óleo de peixe ou óleo de girassol, as dietas ricas em carboidratos e em lipídeos sozinhas foram capazes de aumentar o peso dos tecidos adiposos, das concentrações plasmáticas de HDL – colesterol, colesterol total e glicose em jejum. A dieta hiperlipídica, ainda, gerou piora da intolerância à glicose, pelo aumento da área sob a curva, aumento do ganho de peso e peso do rim, sendo que este foi reduzido pela dieta HC. Neste cenário, o óleo de peixe foi capaz de reduzir a glicemia em jejum na dieta HC e a concentração de colesterol total nas dietas HC e HF.

Entre os parâmetros de função renal, as duas dietas alteraram a hemodinâmica renal ao reduzir a taxa de filtração glomerular e o fluxo urinário, este aumentado pelo óleo de peixe na dieta HC. Reduziram também a osmolalidade urinária, no caso da dieta HF, efeito revertido pelo óleo de peixe, e a osmolalidade plasmática e urinária, no caso da HC, aumentando o *clearance* de água livre. As dietas diminuíram a excreção urinária de tromboxano B₂, não modificando a excreção de prostaglandina E₂. Além disso, a dieta rica em carboidrato elevou a excreção urinária de proteínas totais. Já a dieta rica em lipídeos afetou, além do mais, o manejo tubular de sódio, possivelmente estimulando maior reabsorção tubular de sódio, com redução da carga excretada e na fração de excreção deste ion. Esta dieta aumentou também, a excreção urinária de albumina e a concentração de TNF- α no tecido renal, dois marcadores de injúria renal induzida pela inflamação tecidual.

No modelo proposto, tanto pela dieta rica em carboidrato e em lipídeos, foram observadas alterações morfológicas no tecido renal. Entre os marcadores modificados temos que a dieta HC por si só foi capaz de aumentar o número de células positivas para vimentina e para PCNA no interstício renal. Já a dieta HF, apresentou diferenças significativas no aumento de células positivas para vimentina no interstício e nos túbulos renais. Além do mais, as dietas alteraram a expressão protéica no tecido renal, com redução da expressão de COX-2 pela ração HF e da AMPK pela ração HC.

A suplementação com óleo de girassol não foi utilizada em todas as análises propostas, entretanto nos parâmetros analisados, o óleo de girassol foi capaz de alterar a taxa de tolerância à glicose dos animais com dieta padrão, com aumento da área sob a curva e elevação da insulinemia. Além disso, apresentou um efeito aditivo ao consumo de ração hiperlipídica nestes parâmetros de resistência insulina, mas não apresentou alterações efetivas na função renal.

Entretanto, o óleo de peixe apresentou efeito anti-inflamatório sistêmico e renal sobre a dieta hiperlipídica, aumentando a concentração de adiponectina no plasma e reduzindo a de TNF- α no plasma e no tecido renal. Ademais, o OP modificou positivamente marcadores de injúria tecidual renais, com redução do número de células positivas para vimentina nos túbulos e para pJNK nos glomérulos, do score de marcação de α -SMA nos glomérulos e no espaço tubulointersticial, principalmente no grupo com dieta hiperlipídica, relacionando os efeitos positivos do OP sobre o processo de transição epitélio-mesenquimal que precede a fibrose renal. Os efeitos positivos dos grupos suplementados com óleo de peixe podem ter derivado do incremento na concentração de EPA e DHA incorporados no tecido renal destes animais, em detrimento das concentrações de ácidos graxos n-6.

Percebe-se então, que o modelo de obesidade e intolerância à glicose é gerado mais eficazmente pela ração hiperlipídica, apresentando alterações em parâmetros metabólicos, de função renal e inflamatórios sistêmicos e renais. Estas modificações possivelmente são tempo-dependente, encontrando, por exemplo, alterações iniciais de dano renal. No modelo induzido pela ração hiperlipídica o óleo de peixe reverteu parcialmente as alterações na função renal e, especialmente, nos parâmetros de inflamação sistêmica e renal, interferindo contra a progressão da injúria renal induzida pela obesidade.

7 CONCLUSÃO

As alterações causadas pelas dietas modificadas (HC e HF) foram:

- Aumento dos pesos dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal;
- Aumento do colesterol total, LDL-colesterol, glicemia em jejum;
- Alterações na hemodinâmica renal, com redução da taxa de filtração glomerular e fluxo urinário;
- Redução da osmolalidade plasmática, pela dieta HC, e da osmolalidade urinária pelas duas dietas, com aumento do *clearance* de água livre;
- Redução da excreção urinária de tromboxano B₂;
- Alterações na morfologia renal, com aumento das células positivas para vimentina e PCNA no interstício renal, pela dieta HC, e aumento das células positivas para vimentina no interstício e túbulos renais;
- Redução da expressão protéica de AMPK, pelo grupo HC, e de COX-2 pela ração HF.

Ainda, houve alterações somente pelo consumo de ração hiperlipídica, sendo:

- Aumento da glicemia em todos os tempos no teste de tolerância à glicose, com aumento da área sob a curva gerando intolerância à glicose e possivelmente resistência à insulina;
- Aumento do ganho de peso;
- Alterações no manejo tubular de sódio possivelmente por aumento da retenção tubular de sódio pelas reduções na carga excretada e fração de filtração de sódio;
- Aumento da microalbuminúria e da concentração de TNF- α renal.

O óleo de peixe foi capaz de atenuar ou reverter algumas alterações causadas pelas dietas modificadas, dentre as quais se destacam:

- Aumentou a incorporação de ácidos graxos da família n-3 em detrimento da família n-6 no tecido renal;
- Reduziu o colesterol total nas duas dietas e a glicemia em jejum na dieta HC;
- Aumentou o fluxo urinário (HCOP) e a osmolalidade urinária (HFOP);

- Reduziu a microalbuminúria, a concentração renal e plasmática de TNF- α e aumentou a concentração plasmática de adiponectina (HFOP);
- Modificou positivamente as alterações morfológicas no tecido renal, com redução células positivas para vimentina em células tubulares e a para pJNK nos glomérulos, e reduziu o score de extensão para α -SMA nos glomérulos e no espaço tubulointersticial

A partir dos resultados expostos verifica-se que a dieta hiperlipídica apresenta maior capacidade de induzir modelo de obesidade com alterações sistêmicas e renais e que a suplementação com óleo de peixe apresentou efeitos anti-inflamatórios sistêmicos e renais, mesmo sem modificações em parâmetros metabólicos, revertendo parcialmente as modificações geradas por modelo animal de obesidade.

REFERÊNCIAS

ABESO – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. Atualização das diretrizes para o tratamento farmacológico da obesidade e do sobrepeso. **Abeso**, v.76, p.47-55, 2010.

ABUSHUFA, R.; REED, P.; WEINKOVE, C.; Fatty acids erythrocytes measured by isocratic HPLC. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1707-1712, 1994.

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2004.

ALIKHAN, M. A.; RICARDO, S. D. Mononuclear phagocyte system in kidney disease and repair. **Nephrology**, v.18, p.81-91, 2013.

ANDERS, H.; VIELHAUDER, V.; SCHLÖNDORFF, D. Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. **Kidney International**, v.63, p.401-415, 2003.

ARAÚJO, E. P.; DE SOUZA, C. T.; UENO, C.; CINTRA, D. E.; BERTOLO, M. B.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A.. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. **Endocrinology**, v. 148, n. 12, p. 5991-5997, 2007.

BAK, M.; THOMSEN, K. Effects of the adenosine A1 receptor inhibitor FK 838 on proximal tubular fluid output in rats. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.19, p.1077-1082, 2004.

BALBI, A. P. C.; MARIN, E. C. S.; FRANCESCATO, H. D. C.; COSTA, R. S.; COIMBRA, T. M. MAPK and angiotensin II receptor in kidney of newborn rats from losartan-treated dams. **Pediatric Nephrology**, v.23, p.1433-1444, 2008.

BAUMANN, K. H.; HESSEL, F.; LARASS, I.; MÜLLER, T.; ANGERER, P.; KIEFL, R.; VON SCHACHY, C. Dietary ω -3, ω -6, and ω -9 unsaturated fatty acids and growth factor and cytokine gene expression in unstimulated and stimulated monocyte. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.19, p.56-66, 1999.

BERGMAYER, H. U. **Methods of Enzymatic Analysis**. Tomo 9, p. 449-453, VCH Publishers, Florida, 1985.

BHATTACHARYA, A.; SUN, D.; RAHMAN, M.; FERNANDES, G. Different ratios of eicosapentaenoic and docosahexaenoic omega-3 fatty acids in commercial fish oils differentially alter pro-inflammatory cytokines in peritoneal macrophages from C57BL/6 female mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.18, p.23-30, 2007.

BOER, P.; MORELLI, J. M.; FIGUEIREDO, J. F.; GONTIJO, J. A. R. Early altered renal sodium handling determined by lithium clearance in spontaneously hypertensive rats (SHR): role of renal nerves. **Live Sciences**, v.76, p.1805-1815, 2005.

BÖRGESON, E.; SHARMA, K. Obesity, immunomodulation and chronic kidney disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v.13, p.1-7, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAND-MILLER, J. C.; HOLT, S. H. A.; PAWLAK, D. B.; McMILLAN, J. Glycemic index and obesity. **The American of Clinica Nutrition**, v.76, p.281-285, 2002.

BRUCE, K. D.; HANSON, M. A. The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome. **The Journal of Nutrition**, v.140, n.3, p.648-652, 2010.

BURTON-FREEMAN, B. Dietary fiber and energy regulation. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.272S-275S, 2000.

CALDER, P. C. Dietary arachidonic acid: harmful, harmless or helpful? **British Journal of Nutrition**, v.98, p. 451-453, 2007.

_____. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. **The Journal of Nutrition**, v.25, p.592S-599S, 2012.

CARVALHO, B. M.; GUADAGNINI, D.; TSUKUMO, D. M. L.; SCHENKA, A. A.; LATUF-FILHO, P.; VASSALLO, J.; DIAS, J. C.; KUBOTA, L. T.; CARVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signaling in high-fat fed mice. **Diabetologia**, v.55, p.2823-2834, 2012.

CHENG, S.; POLLOCK, A. S.; MAHIMKAR, R.; OLSON, J. L.; LOVETT, D. H. Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.20, p.1248-1256, 2006.

COELHO, I.; CASARE, F.; PEQUITO, D. C. T.; BORGHETTI, G.; YAMAZAKI, R. Y.; BRITO, G. A. P.; KRYCZYK, M.; FERNANDES, L.C.; COIMBRA, T. C.; FERNANDEZ, R. Fish oil supplementation reduces cachexia and tumor growth while improving renal function in tumor-bearing rats. **Lipids**, v.47, n.11, p.1031-1041, 2012.

COIMBRA, T. M.; JANSSEN, U.; GRÖNE, H. J.; OSTENDORF, T.; KUNTER, U.; SCHMIDT, H.; BRABANT, G.; FLOEGE, J. Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. **Kidney International**, v.57, p.167-182, 2000.

COSTELLO-BOERRIGTER, L. C.; SMITH, W. B.; BOERRIGTER, G.; OUYANG, J.; ZIMMER, C. A.; ORLANDI, C.; BURNETT JR, J. C. Vasopressin-2-receptor antagonism augments water excretion without changes in renal hemodynamics or sodium and potassium excretion in human heart failure. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, 290, p.273-278, 2006.

DECLÈVES, A. E.; MATHEW, A. V.; CUNARD, R.; SHARMA, K. AMPK mediates the initiation of kidney disease induced by a high-fat diet. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.22, n.10, p.1846-1855, 2011.

DEJI, N.; KUME, S. ARAKI, S.; SOUMURA, M. SUGIMOTO, T.; ISSHILI, K.; CHIN-KANASAKI, M.; SAKAGUCHI, M.; KOYA, D.; HANEDA, M.; KASHIWAGI, A.; UZU, T. Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v.296, p.118-126, 2009.

DIAZ ENCARNACION, M. M.; WARNER, G. M.; GRAY, C. R.; CHENG, J.; KERYAKOS, H. K. H.; NATH, K. A.; GRANDE, J. P. Signaling pathways modulated by fish oil in salt-sensitive hypertension. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v.294, p.1323-1335, 2008.

DIAZ ENCARNACION, M. M.; WARNER, G. M.; CHENG, J.; GRAY, C. R.; NATH, K. A.; GRANDE, J. P. N-3 Fatty acids block TNF- α -stimulated MCP-1 expression in rat mesangial cells. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v.300, p.1142-1151, 2011.

DOBRZYN, A.; DOBRZYN, P.; MIYAZAKI, M.; NTAMBI, J. M. Polyunsaturated fatty acids do not activate AMP-activated protein kinase in mouse tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.332, p.892-896, 2005.

DOLEGOWSKA, B.; PUKULA, E.; SAFRANOW, K.; OLSZEWSKA, M.; JAKKUBOWSKA, K.; CHLUBEK, D.; GUTOWSKI, P. Metabolism of eicosanoids and their action on renal function during ischaemia and reperfusion: the effect of alprostadil. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.75, p.403-411, 2006.

DONADIO J. V. n-3 Fatty acids and their role in nephrologic practice. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 10, p.639-642, 2001.

EBBELING, C. B.; LEIDIG, M. M.; SINCLAIR, K. B.; SEGER-SHIPPEE, L. G.; FELDMAN, H. A.; LUDWIG, D. S. Effects of an ad libitum low-glycemic load diet on cardiovascular disease risk factors in obese young adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p.976-982, 2005.

EJERBLAD, E.; FORED, C. M.; LINDBLAD, P.; FRYZEK, J.; MCLAUGHLIN, J. K.; NYRE'N, O. Obesity and risk for chronic renal failure. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.17, p.1695-1702, 2006.

EKNOYAN, G. Obesity and chronic kidney disease. **Nefrologia**, v.31, n.4, p.397-403, 2011.

ELMARAKBY, A.; IMIG, J. D. Obesity is the major contributor to vascular dysfunction and inflammation in high fat diet hypertensive rats. **Clinical Science (London)**, v.118, n.4, p.291-301, 2010.

FARAG, Y. M. K.; GABALLA, M. R. Diabetes: an overview rising epidemic. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.26, p.35-41, 2011.

FEDOR, D.; KELLEY, D. S. Prevention of insulin resistance by n-3 polyunsaturated fatty acids. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.12, p.138-146, 2009.

FEIG, J. E.; RONG, J. X.; SHAMIR, R.; SANSON, M.; VENGRENKYUK, Y.; LIU, J.; RAYNER, K.; MOORE, K.; GARABEDIAN, M.; FISHER, E. A. HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.108, n.34, p.1-6, 2011.

FERNANDEZ, M. L.; WEST, K. L. Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. **The Journal of Nutrition**, v.135, p.2075-2078, 2005.

FERRUCCI, L.; CHERUBINI, A.; BANDINELLI, S.; BARTALI, B.; CORSI, A.; LAURETANI, F.; MARTIN, A.; ANDRES-LACUEVA, C.; SENIN, U.; GURALNIK, J. M. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.91, n.2, p.439-446, 2006.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipid from animal tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FOSTER, M.C. HWANG, S.; PORTER, S. A.; MASSARO, J. M.; HOFFMANN, U.; FOX, C. S. Fatty Kidney, Hypertension, and Chronic Kidney Disease : The Framingham Heart Study. **Hypertension**, v.58, p.784-790, 2011.

FRANCESCATO, H. D. C.; COSTA, R. S.; BARBOSA JUNIOR, F.; COIMBRA, T. M. Effect of JNK inhibition on cisplatin-induced renal damage. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.22, p.2138-2148, 2007.

FRASER, S.; MOUNT, P.; HILL, R.; LEVIDIOTIS, V.; KATSI, F.; STAPLETON, D.; KEMP, B. E.; POWER, D. A. Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase in the kidney by dietary salt intake and osmolality. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v.288, p.578-586, 2005.

FRITSCHKE, K. Fatty acids as modulators of the immune response. **Annual Review of Nutrition**, v. 26, p.45-73, 2006.

GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; ESPOSITO, K. The effects of diet on inflammation: emphasis on the metabolic syndrome. **Journal of the American College of Cardiology**, v.48, n.4, p.677-685, 2006.

GOVINDARAJAN, G.; WHALEY-CONNELL, A.; MUGO, M.; STUMP, C.; SOWERS, J. R. The cardiometabolic syndrome as a cardiovascular risk factor. **The American Journal of the Medical Sciences**, v.330, n.6, p.311-318, 2005.

GREENBERG, A. S.; McDANIEL, M. L. Identifying the links between obesity, insulin resistance and β -cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. **European Journal of Clinical Investigation**, v.32, suppl.3, p.24-34, 2002.

HALL, J. E.; HENEGAR, J. R.; DWYER, T. M.; LIU, J.; da SILVA, A. A.; KUO, J. J.; TALLAM, L. Is obesity a major cause of chronic kidney disease? **Advances in Renal Replacement Therapy**, v.11, n.1, p.41-54, 2004.

HALL, J. E. The kidney, hypertension, and obesity. **Hypertension**, v.41, p.625-633, 2003.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition Research Reviews**, v.23, p.270-299, 2010.

HARRIS Jr. R. C.; BREYER, M. D. Arachidonic Acid Metabolites in the Kidney. In: **The Kidney**. 8th Edited by BRENER, B. M., 2007, Chapter 11.

HAO, C.; BREYER, M. D. Physiological Regulation of Prostaglandins in the Kidney. **Annual Review of Physiology**, v.70, p.357-377, 2008.

HENEGAR, J. R.; BIGLER, S. A.; HENEGAR, L. K.; TYAGI, S. C.; HALL, J. E. Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.12, p.1211-1217, 2001.

HENRY, R. J.; CANNON, D. C.; WINKEKMAN, J. W. **Clinical Chemistry, Principles and Technics**. 2nd. Ed. New York, Harper & Row. 1974.

HONG, S.; LU, Y. Omega-3 fatty acid-derived resolvins and protectins in inflammation resolution and leukocyte functions: targeting novel lipid mediator pathways in mitigation of acute kidney injury. **Frontiers in Immunology**, v.4, p.1-8, 2013.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**. Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. IBGE: Rio de Janeiro, 2010.

IKEZUMI, Y.; HURST, L.; ATKINS, R. C.; NIKOLIC-PATERSON, D. J. Macrophage-mediated renal injury is dependent on signaling via the JNK pathway. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.15, p.1775-1784, 2004.

IX, J. H.; SHARMA, K. Mechanisms linking obesity, chronic kidney disease, and fatty liver disease: the roles of fetuin-A, adiponectin, and AMPK. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.21, p.406-412, 2010.

JÉQUIER, E. Pathways to obesity. **International Journal of Obesity**, v.26, suppl. 2, p.12-17, 2002.

JIANG, T.; WANG, Z.; PROCTOR, G.; MOSKOWITZ, S.; LIEBMAN, S. E.; ROGERS, T.; LUCIA, M. S.; LI, J.; LEVI, M. Diet-induced obesity in C57CL/6C mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.37, p.32317-32325, 2005.

JINDE K.; NIKOLIC-PATERSON, D. J.; HUANG, X. R.; SAKAI, H.; KUOKWA, K.; ATKINS, R. C.; LAN, H. Y. Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis **American Journal of Kidney Disease**, v.38, p.761-769, 2001.

JUMP, D. B.; BOTOLIN, D.; WANG, Y.; XU, J.; CHRISTIAN, B.; DEMEURE, O. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **Journal of Nutrition**, v.135, p.2503-2506, 2005.

JÜRGENS, H. S.; NESCHEN, S.; ORTMANN, S.; SCHERNECK, S.; SCHMOLZ, K.; SCHÜLER, G.; SCHMIDT, S.; BLÜHER, M.; KLAUS, S.; PEREZ-TILVE, D.; TSCHÖP, M. H.; SCHÜRMANN, A.; JOOST, H.-G. Development of diabetes in obese, insulin-resistant mice: essential role of dietary carbohydrate in beta cell destruction. **Diabetologia**, v.50, p.1481-1469, 2007.

KACSO, I.; LENGHEL, A.; BONDOR, C. I.; MOLDOVAN, D.; RUSU, C.; NITA, C.; KACSO, G.; HANCU, N.; CAPRIOARA, M. G. Low plasma adiponectin levels predict increased urinary albumin/creatinine ratio in type 2 diabetes patients. **International Urology and Nephrology**, v.44, p.1151-1157, 2012.

KALUPAHANA, N. S.; CLAYCOMBE, K.; NEWMAN, S. J.; STEWART, T.; SIRIWARDHANA, N.; MATTHAN, N.; LICHTENSTEIN, A. H.; MOUSTAID-MOUSSA, N. Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation. **The Journal of Nutrition**, v.140, p.1915-1922, 2010.

KASINATH, B. S.; FELIERS, D.; SATARANATARAJAN, K.; CHOUDHURY, G. G.; LEE, M. J.; MARIAPPAN, M. M. Regulation of mRNA translation in renal physiology and disease. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v.297, p.1153-1165, 2009.

KNIGHT, S. F.; YUAN, J.; ROY, S.; IMIG, J. D. Simvastatin and tempol protect against endothelial dysfunction and renal injury in a model of obesity and hypertension. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v.298, p.86-94, 2010.

KOLB, H.; MANDRUP-POULSEN, T. Na immune origin of type 2 diabetes? **Diabetologia**, v.48, p.1038-1050, 2005.

KOOMAN, J. P. Estimation of renal function in patients with chronic kidney disease. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v.30, p.1341-1346, 2009.

KOPPLE, J. D.; FERROZE, U. The effect of obesity on chronic kidney disease. **Journal of Renal Nutrition**, v.21, n.1, p.66-71, 2011.

KOPPLE, J. D. Obesity and chronic kidney disease. **Journal of Renal Nutrition**, v.20, n.58, p.29-30, 2010.

KURUKULASURIYA, L. R., STAS, S., LASTRA, G., MANRIQUE, C., SOWERS, J. R. Hypertension in Obesity. **Medical Clinics of North America**, v.95, p.903-917, 2011.

LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, v. 227, p. 680-85, 1970.

LEE, S. M.; AN, W. S. Cardioprotective effects of ω -3 PUFAS in chronic kidney disease. **BioMed Research International**, 2013, 1-8, 2013.

LI, J. H.; WANG, W.; HUANG, X. R.; OLDFIELD, M.; SCHMIDT, A. M; COOPER, M. E.; LAN, H. Y. Advanced glycation end products induce tubular epithelial-myofibroblast transition through the RAGE-ERK1/2 MAP kinase signaling pathway **American Journal of Pathology**, v.164, n.4, p.1389-1397, 2004.

LOMBARDO, Y. B.; CHICCO, A. G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.17, p1-13, 2006.

LOMBARDO, Y. B.; HEIN, G.; CHICCO, A. Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. **Lipids**, v.42, p.427-437, 2007.

LORENTE-CEBRIÁN, S.; COSTA, A. G. V.; NAVAS-CARRETERO, S.; ZABALA, M.; MARTÍNEZ, J. A.; MORENO-ALIAGA, M. J. Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v.69, p.633-651, 2013.

LUDWIG, D. S. The glycemic index. Physiological mechanisms relating to obesity, diabetes, and cardiovascular disease. **The Journal of the American Medical Association**, v.287, p.2414-2423, 2002.

MA, F. Y.; LIU, J.; NIKOLIC-PATERSON D. J. The role of stress-activated protein kinase signaling in renal pathophysiology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.42, p.29-37, 2009.

MAKINO, H.; TANAKA, I.; MUKOYAMA, M.; SUGAWARA, A.; MORI, K.; MURO, S.; SUGANAMI, T.; YAHATA, K.; ISHIBASHI, R.; OHUCHIDA, S.; MARUYAMA, T.; NARUMIYA, S.; NAKAO, K. Prevention of diabetic nephropathy in rats by prostaglandin e receptor ep1-selective antagonist. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.13, p.1757-1765, 2002.

MARLETT, J. A.; MCBURNEY, M. I.; SLAVIN, J. L. Position of American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. **Journal of the America Dietetic Association**, v.102, p.993-1000, 2002.

McCANN, D. S.; TOKARSKY, J.; SORKIN, R. P. Radioimmunoassay for plasma thromboxane B2. **Clinical Chemistry**, v.27, n.8, p.1417-1420, 1981.

NANJI, A. A.; ZAKIM, D.; RAEHEMTULLA, A.; DALY, T.; MIAO, L.; ZHAO, S.; KHWAJA, S.; TAHAN, S. R.; DANNENBERG, A. J. Dietary saturated fatty acids down-regulate cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor alfa and reverse fibrosis in alcohol-induced liver disease in the rat. **Hepatology**, v. 26, n.6, p.1538-1545, 1997.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. **American Journal of Kidney Disease**, v.39, p.1-266, suppl.1, 2002.

NOORI, N.; DUKKIPATI, R.; KOVESDY, C. P.; SIM, J. J.; FEROZE, U.; MURALI, S. B. BROSS, R.; BENNER, D.; KOPPLE, J. D.; KALANTAR-ZATEH, K. Dietary omega-3 fatty acid, ratio of omega-6 to omega-3 intake, inflammation, and survival in long-term hemodialysis patients. **American Journal of Kidney Disease**, v.58, n.2, p.248-256, 2011.

PAN, S.Y.; DESMEULES, M.; MORRISON, H. WEN, S. W.; THE CANADIAN CANCER REGISTRIES EPIDEMIOLOGY RESEACH GROUP. Obesity, high energy intake, lack of physical activity, and the risk of kidney cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.15, p.2453-2460, 2006.

PANZER, U.; STEINMETZ, O. M.; STAHL, R. A. K.; WOLF, G. Kidney Diseases and Chemokines. **Current Drug Targets**, v.7, p.65-80, 2006.

PRAGA, M.; MORALES, E. Obesity, proteinuria and progression of renal failure. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.15, p.481-486, 2006.

PREBLE, W. E. Obesity: observations on one thousand cases. **The Boston Medical and Surgical Journal**, v.188, p.617-621, 1923.

PUGLISI, M. J.; HASTY, A. H.; SARASWATHI, V. The role of adipose tissue in mediating the beneficial effects of dietary fish oil. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.22, p.101-108, 2011.

RANGEL-HUERTA, O. D.; AGUILERA, C. M.; MESA, M. D.; GIL, A. Omega-3 long-

chain polyunsaturated fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: a systematic review of randomised clinical trials. **British Journal of Nutrition**, v. 107, p.159S-170S, 2012.

RASMUSSEN, L. E.; SVENSSON, M.; JØRGENSEN, K. A.; SCHMIDT, E. B.; CHRISTENSEN, J. H.; The content of docosahexaenoic acid in serum phospholipid is inversely correlated with plasma homocysteine levels in patients with end-stage renal disease. **Nutrition Research**, v.30, p.535-540, 2010.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **The Journal of Nutrition**, v.127, p. 838S-841S, 1997.

RUXTON, C. H. S. *et al.* The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. **Journal of Human Nutrition & Dietetics**, v.17, p.449-459, 2004.

SALA-VILA, A.; MILES, E. A.; CALDER, P. C. Fatty acid composition abnormalities in atopic disease: evidence explored and role in the disease process examined. **Clinical and Experimental Allergy**, v.38, p.1432-1450, 2008.

SBN – SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Censo de diálise SBN 2012. Disponível em < <http://www.sbn.org.br/pdf/publico2012.pdf>>. Acesso em: 24/03/2014.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v.118, p.2992-3002, 2008.

SCHLONDORFF, D. O. Overview of factors contributing to the pathophysiology of progressive renal disease. **Kidney International**, v.74, p.860-866, 2008.

SHARMA, K.; RAMACHANDRARAO, S.; QIU, G.; USUI, H. K.; ZHU, Y.; DUNN, S. R.; OUEDRAOGO, R.; HOUGH, K.; MCCUE, P.; CHAN, L.; FALKNER, B.; GOLDSTEIN, B. J. Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v.118, n.5, p.1645-1656, 2008.

SHIMIZU, H.; BOLATI, D.; ADIJANG, A.; MUTELIEFU, G.; ENOMOTO, A.; NISHIJIMA, F.; DATEKI, M. NIWA, T. NF- κ B plays an important role in indoxyl sulfate-induced cellular senescence, fibrotic gene expression, and inhibition of proliferation in proximal tubular cells. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v.301, p.1201-1212, 2011.

SIMONSON, M. S. Phenotypic transitions and fibrosis in diabetic nephropathy. **Kidney International**, v.71, p.846-854, 2007.

SIMOPOULOS, A. P. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and high fructose intake in the development of metabolic syndrome, brain metabolic abnormalities, and non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrients**, v.5, p.2901-2923, 2013.

SRINIVASAN, K.; RAMARAO, P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. **The Indian Journal of Medical Research**, v.125, p.451-472, 2007.

STEINBERG, G. R.; KEMP, B. E. AMPK in health and disease. **Physiological Reviews**, v.89, p.1025-1078, 2009.

STINGHEN, A. E. M.; GONÇALVES, S. M.; MARTINES, E. G.; NAKAO, L. S. RIELLA, M. C.; AITA, C. A.; PECOITS-FILHO, R. Increased plasma and endothelial cell expression of chemokines and adhesion molecules in chronic kidney disease. **Nephron Clinical Practice**, v.111, p.117-126, 2009.

STITT-CAVANAGH, E.; MACLEOD, L.; KENNEDY, C. R. J. The podocyte in diabetic kidney disease. **The Scientific World Journal**, v.9, p.1127-1139, 2009.

TANNER, G. A. Kidney function. Chapter 22. In: RHOADES, R.; BELL, D. R. **Medical physiology: principles for clinical medicine**. Philadelphia (EUA): Lippincott Williams & Wilkins, 2009. 816p.

TAYLOR, B. A.; PHILLIPS, S. J. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. **Genomics**, v.34, p.389-398, 1996.

TAYYEBI-KHOSROSHAHI, H.; HOUSHYAR, J.; DEHGAN-HESARI, R.; ALIKHAH, H.; VATANKHAH, A.; SAFAEIAN, A.; ZONOUZ, N. R. Effect of treatment with omega-3 fatty acids on c-reactive protein and tumor necrosis factor-alfa in hemodialysis patients. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, v.23, n. 2, p.500-506, 2012.

TESAURO, M.; MASCALI, A.; FRANZESE, O.; CIPRIANI, S.; CARDILLO, C.; DI DANIELE, N. Chronic kidney disease, obesity, and hypertension: the role of leptin and adiponectin. **International Journal of Hypertension**, v.2012, p.1-7, 2012.

THOMAS, G. L.; YANG, B.; WAGNER, B. E.; SAVILL, J.; NAHAS, A. M. E. Cellular apoptosis and proliferation in experimental renal fibrosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.13, p.2216-2226, 1998.

THOMSEN, K; NIELSEN, C. B.; FLYVBJERG, A. Effects of glycine on glomerular filtration rate and segmental tubular handling of sodium in conscious rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.29, p.449-454, 2002.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, v.76, p.4350-4354, 1979.

VAN BIESEN, W.; DE BACQUER, D.; VERBEKE, F.; DELANGHE, J.; LAMEIRE, N.; VANHOLDER, R. The glomerular filtration rate in an apparently healthy population and its relation with cardiovascular mortality during 10 years. **European Heart Journal**, v.28, p.478-483, 2007.

VELASQUEZ, M. T.; KIMMEL, P. L.; MICHAELIS, O. E. Animal models of spontaneous diabetic kidney disease. **The Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.4, p.2850-2859, 1990.

YAMAMOTO, K.; ITOH T.; ABE, D.; SHIMIZU, M.; KANDA, T.; KOYAMA, T.; NISHIKAWA, M.; TAMAI, T.; OIZUMI, H.; YAMADA, S. Identification of putative metabolites of docosahexaenoic acid as potent PPAR γ agonists and antidiabetic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, p.517-522, 2005.

WAHBA, I. M.; MAK, R. H. Obesity and obesity-initiated metabolic syndrome: mechanistic links to chronic kidney disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v.2, p.550-562, 2007.

WANDER, R. C.; HALL, J. A.; GRADIN, J. L.; DU, S.; JEWELL, D. E. The ratio of dietary (n-6) to (n-3) fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged dogs. **The Journal of Nutrition**, v. 127, p.1198-1205, 1997.

WOLEVER, T. M. S.; MEHLING, C. Long-term effect of varying the source or amount of dietary carbohydrate on postprandial plasma glucose, insulin, triacylglycerol, and free fatty acid concentrations in subjects with impaired glucose tolerance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p.612-621, 2003.

WONG, C. Y.; YIU, K. H.; LI, S. W.; LEE, S.; TAM, S.; LAU, C. P.; TSE, H. F. Fish-oil supplement has neutral effects on vascular and metabolic function but improves renal function in patients with type 2 diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, v.27, p.54-60, 2010.

WU, Y.; LIU, Z.; XIANG, Z.; ZENG, C.; CHEN, Z.; MA, X.; LI, L. Obesity-related glomerulopathy: insights from gene expression profiles of the glomeruli derived from renal biopsy samples. **Endocrinology**, v.147, n.1, p.44-50, 2006.

WU, J. H. Y.; MICHA, R.; IMAMURA, F.; PAN, A.; BIGGS, M. L.; AJAZ, O.; DJOUSSE, L.; HU, F. B. MOZAFFARIAN, D. Omega-3 fatty acids and incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **British Journal of Nutrition**, v.107, p.214-227, 2012.

ZEISBERG, M.; NEILSON, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. **The Journal of Clinical Investigation**, v.119, p.1429-1437, 2009.

ZOCCALI, C. Overweight, obesity and metabolic alterations in chronic kidney disease. **Prilozi**, v.30, n.2, p.17-31, 2009.

ANEXO



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 476B

CERTIFICADO

O Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".


PROCESSO: 23075.033500/2010-30

APROVADO: RO 07/2010 - 17/08/2010
Alteração aprovada em
15/12/2011 – R.O. 11/2011

TÍTULO: Avaliação dos efeitos da suplementação crônica com óleo de peixe sobre a função renal de camundongos diabéticos tipo II induzidos por dieta hiperlipídica e estreptozotocina

AUTORES: Ricardo Fernandes Perez, Ana Lucia Tararhuch, Isabela Coelho de Castro, Luiz Claudio Fernandes

DEPARTAMENTO: Fisiologia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador do CEUA